

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

{Exhibit 24}

DE-A-2618419, published April 11, 1976



Office of the European Search
Revised: SEP 29 10 62 06 9
Yacht: EN 2-1

DT 26 18

Offenlegungsschrift 26 18 419

⑪

⑫

⑬

⑭

Aktenzeichen:

P 26 18 419.0-52

Anmeldetag:

27. 4. 76

Offenlegungstag:

4. 11. 76

Bibliothek

Bur. Ind. Eigentum

⑮

Unionspriorität:

⑯ ⑰ ⑱

28. 4. 75 USA 572008

22 Dec. 1976

⑥

Bezeichnung:

Heterogenes spezifisches Bindungsverfahren zur Bestimmung eines
Liganden in einem flüssigen Medium und Mittel zu dessen Durchführung

⑦

Anmelder:

Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Ind. (V.St.A.)

⑧

Vertreter:

Wuesthoff, F., Dr.-Ing.;
Pechmann, E. Frhr. von, Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Behrens, D., Dr.-Ing.;
Goetz, R., Dipl.-Ing. Dipl.-Wirtsch.-Ing.; Pat.-Anwälte, 8000 München

⑨

Erfinder:

Boguslaski, Robert Charles, Elkhart; Carrico, Robert Joseph, Bremen;
Ind.; Christner, James Edward, Ann Arbor, Mich. (V.St.A.)

Prüfungsantrag gem. § 28 b PatG ist gestellt

20.11.76 10.11.76



2618419
1A-47 862

B e s c h r e i b u n g
zu der Patentanmeldung

MILES LABORATORIES, INC.
Elkhart, Indiana 46514, USA

betreffend:

"Heterogenes spezifisches Bindungs-
verfahren zur Bestimmung eines Liganden
in einem flüssigen Medium

Die Erfindung betrifft ein heterogenes spezifisches Bindungs-Bestimmungsverfahren, beidem eine Substanz mit Reaktionsfähigkeit angewandt wird, d.h. ein Reagens als Markierungssubstanz zum Nachweis eines Liganden in einem flüssigen Medium. Das Verfahren wird durchgeführt mit Hilfe eines Reaktions-^{mittels} das als markierten Bestandteil ein Konjugat umfaßt, das gebildet worden ist aus einer spezifisch bindenden Substanz, die an das Reagens gebunden ist. Das Reagens ist günstigerweise ein enzymatisches Reagens, wie ein Enzymsubstrat oder Coenzym. Die Aktivität des konjugierten Reagenses als Bestandteil eines vorher bestimmten Reaktionssystems wird angewandt als Mittel zur Überwachung bzw. zum Nachweis des Ausmaßes der Bindung des markierten Bestandteils in üblichen heterogenen spezifischen Bindungs-Bestimmungsverfahren. Das Vorliegen eines Liganden in einem flüssigen Medium kann bestimmt werden nach üblichen Konkurrenz-Bindungsverfahren. Nach der erforderlichen

609845/1072

Trennung der gebundenen von der freien Phase, die bei dem spezifischen Bindungs-Reaktionssystem auftreten, wird das Ausmaß der Bindung des markierten Bestandteils bestimmt, indem man eine der Phasen mit den erforderlichen Substanzen zusammenbringt, um das vorher bestimmte Nachweisreaktionssystem zu bilden, bei dem die Markierungssubstanz aktiv ist und die Reaktionsfähigkeit darin bestimmt.

Die Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Bestimmung des Vorhandenseins von Liganden in einem flüssigen Medium auf der Grundlage der Affinität des Liganden zu einem spezifisch bindenden Partner dazu. Besonders betrifft die Erfindung Verfahren und Mittel zur Anwendung bei spezifischen Bindungsbestimmungen, bei denen keine radioaktiven Substanzen oder modifizierten Enzyme als Markierungssubstanz angewandt werden.

Der Bedarf an einem bequemen zuverlässigen und nicht gefährlichen Mittel zur Bestimmung des Vorhandenseins geringer Konzentrationen von Substanzen in Flüssigkeiten, ist selbstverständlich. Das ist besonders der Fall auf dem Gebiet der klinischen Chemie, wo Bestandteile von Körperflüssigkeiten, die in so geringen Konzentrationen, wie 10^{-11} molar pathologische Bedeutung besitzen können. Die Schwierigkeit, derartig geringe Konzentrationen nachzuweisen, tritt besonders auf auf dem Gebiet der klinischen Chemie, wo die Probengröße üblicherweise sehr begrenzt ist.

Klassisch werden Substanzen in Flüssigkeiten nachgewiesen aufgrund eines Reaktionsschemas, bei dem die nachweisende Substanz ein notwendiges Reagens ist. Das Vor-

handensein der unbekannten Substanz wird angezeigt durch das Auftreten eines Reaktionsproduktes oder das Verschwinden eines bekannten Reagenses. In einigen Fällen kann ein solches Bestimmungsverfahren quantitativ sein aufgrund der Messung von entweder der Geschwindigkeit, mit der das Produkt auftritt oder das Reagens verschwindet oder durch Messung der Gesamtmenge an entstandenem Produkt oder verbrauchtem Reagens bei Erreichung des Gleichgewichts. Jedes Bestimmungs-Reaktionssystem ist notwendigerweise entweder auf die Anwendung zum Nachweis nur einer kleinen Gruppe von Substanzen beschränkt oder es ist nicht spezifisch.

Die Suche nach Bestimmungsverfahren, die hochspezifisch aber auf den Nachweis eines weiten Bereiches von Substanzen anwendbar sind, hat zu den radioimmunologischen Bestimmungsverfahren geführt. Bei diesem System läßt man eine bekannte Menge einer radioaktiv markierten Form der nachzuweisenden Substanz mit der unbekannten Substanz bzw. unbekannten Menge der Substanz um eine begrenzte Menge von Antikörper, der zu der nachzuweisenden Substanz spezifisch ist, in Konkurrenz treten. Die Menge an markierter Form, die an den Antikörper gebunden wird, ändert sich umgekehrt mit der Menge an der nachzuweisenden Substanz. Bei radioimmunologischen Bestimmungsverfahren ist es unumgänglich notwendig, die markierte Form der nachzuweisenden Substanz, die an den Antikörper gebunden ist - die gebundene Phase - von dem nicht gebundenen Teil - der freien Phase - zu trennen. Während verschiedene Wege entwickelt worden sind, diese erforderliche Trennung zu erreichen (US-PS 3 505 019, 3 555 143, 3 646 346, 3 720 760 und 3 793 445) ist bei allen ein getrennter Schritt, wie Filtrieren, Zentrifugieren, Waschen oder Abziehen des flüssigen Anteils aus

einer Säule erforderlich, um eine wirksame Trennung der gebundenen von der freien Phase sicherzustellen. Eine solche Trennung wird häufig erreicht durch Bildung eines Systems, umfassend einen unlöslichen Anteil, enthaltend die gebundene Phase, und einen flüssigen Anteil, enthaltend die freie Phase, so daß die Menge an radioaktiv markierter Substanz in jedem Anteil eine Funktion des Ausmaßes der Bindung der markierten Substanz ist und damit eine Funktion der in der zu untersuchenden Probe vorhandenen Menge an Liganden. Der Ausdruck "heterogen", wie er allgemein in der wissenschaftlichen Literatur verwendet wird und hier angewandt wird, bezeichnet diejenigen spezifischen Bindungsbestimmungen, bei denen eine Trennung der gebundenen von der freien Phase durchgeführt wird. Eine solche Trennung ist erforderlich, um eine spezifische Bindungsbestimmung durchzuführen, bei der die markierte Substanz in der gebundenen Phase nicht unterscheidbar ist von derjenigen in der freien Phase.

Aufgrund der gefährlichen und schwierigen Handhabung von radioaktiven Substanzen sind zahlreiche Versuche unternommen worden, bequeme spezifische Bindungs-Bestimmungssysteme zu entwickeln, die ebenso empfindlich und schnell sind wie radioimmunologische Bestimmungen, aber die andere Eigenschaften als die Radioaktivität als Mittel zum Nachweis bzw. zur Überwachung der Bindungsreaktion anwenden. Wie später näher diskutiert wird, umfassen Substanzen, die als Markierungssubstanz anstelle von radioaktiven Atomen oder Molekülen angewandt worden sind, verschiedene Substanzen, wie Enzyme, Fluoreszens-Moleküle und Bacteriophagen.

Beispiele für Verfahren, bei denen ein Enzym als Markierungssubstanz verwendet wird, sind beschrieben in den

US-PS 3 654 090, 3 791 932, 3 839 153, 3 850 752 und 3 879 262 und in Journal of Immunological Methods 1, 247 (1972) und in Journal of Immunology 109, 129 (1972). Bei jedem dieser beschriebenen Verfahren wird ein Enzym chemisch entweder an den nachzuweisenden Liganden oder einen Bindungspartner davon gekuppelt und dadurch ein entsprechendes heterogenes spezifisches Bindungs-Reaktions-schema gebildet, wodurch nach der Inkubation mit einer Probe die Menge an Enzymaktivität, die entweder mit dem unlöslichen Teil oder mit dem flüssigen Teil verbunden ist, eine Funktion ist der Ligandenmenge in der Probe. Die mit der Synthese und Charakterisierung von Enzymkonjugaten verbundenen Probleme sind ernste Nachteile dieser Verfahren.

Interessant ist das in der US-PS 3 817 837 beschriebene immunologische Bestimmungsverfahren, bei dem mit Enzym markierte Substanzen angewandt werden. Bei diesem Verfahren wird kein zweiteiliges (partitioned) (d.h. unlöslicher Teil/flüssiger Teil) spezifisches Bindungsreaktionssystem angewandt und dadurch das Trennungsverfahren vermieden, da der mit Enzym markierte Ligand so ausgewählt ist, daß er nach Umsetzung mit dem bindenden Partner des Liganden die Enzymaktivität hemmt. Dadurch kann das Verhältnis von gebundener markierter Substanz zu derjenigen in freier Form bestimmt werden, indem man die Änderungen der Enzymaktivität nachweist. Bei diesem Verfahren tritt jedoch trotzdem die Schwierigkeit auf, gut charakterisierte enzym-markierte Konjugate herzustellen und Enzyme zu finden, die für dieses System geeignet sind.

In den GB-PS 1 392 403 und FR-PS 2 201 299 sind spezifische Bindungsbestimmungen beschrieben, bei denen eine

nicht-aktive Vorstufe einer spektrophotometrisch aktiven Substanz als Markierungssubstanz angewandt wird. Nach Inkubation der Probe mit dem spezifischen Bindungsreaktionssystem werden der unlösliche und flüssige Teil voneinander getrennt und die in dem flüssigen Teil vorhandene Menge der Markierungssubstanz, die eine Funktion der nachzuweisenden Ligandenmenge in der Probe ist, bestimmt durch Durchführung von Reaktionsstufen, die die inaktive Markierungssubstanz in eine chromogen oder fluorometrisch aktive Substanz umwandeln, die dann auf übliche Weise gemessen wird.

Andere spezifische Bindungs-Bestimmungsverfahren, bei denen unterschiedliche Arten von Markierungssubstanzen angewandt werden, sind in der US-PS 3 850 578 beschrieben, bei der die Elektronen-spin -Resonanz als Markierung angewandt wird. In der US-PS 3 901 654 wird die Anwendung von fluoreszenzauslöschenden und verstärkenden Substanzen zur Markierung beschrieben. In dem Report Nr. PB-224 875 des National Technical Information Service (NTIS) des United States Department of Commerce (1973) ist ein erfolgloser Versuch beschrieben, Häminchlorid als Markierungssubstanz in einem heterogenen Bestimmungssystem anzuwenden, das durch Chemilumineszenz überwacht wird. In Nature 219, 186 (1968) sind sehr im Detail bestimmte radioimmunologische Bestimmungsverfahren beschrieben und sehr allgemein die Möglichkeit, Coenzyme und Viren anstelle von Radioisotopen als Markierungssubstanzen zu verwenden, erwähnt. Es ist jedoch nichts darüber ausgesagt, wie ein Bestimmungsverfahren mit Hilfe dieser alternativen Markierungssubstanzen durchgeführt werden kann oder darüber, ob ein derartiges Verfahren tatsächlich durchführbar ist. Ferner wird auf Principles of Competitive Protein-Bindung Assays,

Herausg. Odell und Daughaday (J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1972) verwiesen, wo die verschiedenen bekannten Bestimmungsschemata ausführlich diskutiert werden und einige unterschiedliche Substanzen und Eigenschaften, die zur Markierung von spezifischen Bindungsbestimmungen angewandt werden.

Obwohl viele neue Arten von spezifischen Bindungsbestimmungen beschrieben und untersucht worden sind, bleiben die radioimmunologischen Bestimmungen und die verschiedenen immunologischen Bestimmungen mit Hilfe enzymmarkierter Substanzen, die am weitesten angewandten und verbesserten. Beide Systeme besitzen jedoch offensichtliche Nachteile und zwar die radioimmunologischen Bestimmungen durch die Anwendung von radioaktiven Substanzen, die gefährlich sind und eine vorsichtige Handhabung erfordern und die mit Enzym markierten immunologischen Bestimmungen durch die Schwierigkeit, geeignete enzymmarkierte Konjugate herzustellen.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein neues Verfahren und Mittel zum Nachweis eines Liganden in einer Flüssigkeit zu entwickeln, bei dem keine unbequemen radioaktiven Substanzen oder modifizierten Enzyme als Markierungssubstanz angewandt werden. Das heterogene spezifische Bindungsbestimmungsverfahren und die dafür verwendeten Mittel sollen vielseitiger anwendbar sein und bequemer als die bekannten; dabei soll eine Markierungssubstanz verwendet werden, die mit dem Liganden oder einem spezifischen Bindungspartner davon leichter gekuppelt werden kann als ein Enzym und leichter nachgewiesen werden kann mit Hilfe einer Vielzahl empfindlicher Nachweis- bzw. Überwachungsreaktionssysteme als ein Enzym.

Die Erfindung betrifft ein sehr bequemes vielseitig anwendbares und empfindliches heterogenes spezifisches Bindungsbestimmungsverfahren und Mittel zu dessen Durchführung, bei denen als Markierungssubstanz eine Substanz angewandt wird, die als Bestandteil eines vorher bestimmten Reaktionssystems reaktionsfähig ist und im folgenden als Reagens bezeichnet wird. Die erfindungsgemäß angewandte Markierungssubstanz kann nach irgend einem der üblichen heterogenen spezifischen Bindungsbestimmungsschemata angewandt werden. Die Menge des entweder in gebundener oder freier Form vorliegenden Reagenses wird bestimmt, indem man eine der Phasen mit mindestens einem Reagens zusammenbringt, das mit dem ersten Reagens, das vorher bestimmte Reaktionssystem bildet, das als Mittel zum Nachweis der spezifischen Bindungsreaktion dient. Quantitative Bestimmungen können durchgeführt werden, indem man die Reaktionsfähigkeit, die in einer Phase gemessen wird, mit derjenigen vergleicht, die bei dem gleichen Bestimmungsverfahren bei einem flüssigen Medium erhalten wird, das bekannte Mengen des zu bestimmenden Liganden enthält.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt allgemein die folgenden Stufen:

(a) Zusammenbringen des flüssigen, zu untersuchenden Mediums mit Reagentien, umfassend einen markierten Bestandteil, bestehend aus einem Konjugat eines Reagenses - wie oben beschrieben - als Markierungssubstanz und einer Bindungskomponente, das mit dem zu bestimmenden Liganden ein Bindungsreaktionssystem bildet und zu einer gebundenen Phase und zu einer freien Phase des markierten Bestandteils führt, wobei die Menge der Markierungssubstanz in der entstehenden gebundenen Phase eine Funktion ist der Menge des in der zu untersuchenden Flüssigkeit vor-

handenen Liganden;

(b) Trennung der gebundenen von der freien Phase und

(c) Bestimmung der Menge des Reagenses in der gebundenen oder freien Phase und dadurch der Menge des in dem zu untersuchenden Medium vorhandenen Liganden durch Bestimmung der Reaktionsfähigkeit. Wie später näher diskutiert wird, kann das Bindungsreaktionssystem entsprechend irgend einem der bekannten üblichen Verfahren ausgebildet sein, wie sie für radioimmunologische Bestimmungssysteme und für heterogene enzymimmunologische Bestimmungssysteme angewandt werden.

Das Nachweisreaktionssystem ist vorzugsweise enzymkatalysiert. Üblicherweise wird ein Nachweisreaktionssystem ausgewählt, das hoch empfindlich ist für das Reagens in dem Konjugat. Lumineszenz- oder Fluoreszenz-Reaktionssysteme sind in diesem Zusammenhang sehr geeignet. Besonders bevorzugt sind cyclische Reaktionssysteme, besonders solche, bei denen das Reagens das cyclisierte Material ist. Bei den bevorzugten cyclischen Reaktionssystemen sind die enzymkatalysierten besonders günstig. Das Reagens in dem Konjugat ist üblicherweise ein enzymatisches Reagens, wie ein Enzymsubstrat, oder vorzugsweise ein Coenzym und besitzt vorzugsweise ein Molekulargewicht von weniger als 9 000.

In der vorliegenden Beschreibung werden die folgenden Ausdrücke entsprechend den angegebenen Definitionen angewandt: Ligand ist die Substanz oder Gruppe von Substanzen, deren Vorhandensein oder Menge in einem flüssigen Medium bestimmt werden soll; spezifisch bindender Partner zu dem Liganden ist irgend eine Substanz oder Gruppe von Substanzen, die eine spezifische Bindungsaffinität für den Liganden unter Ausschluß anderer Substanzen besitzt

und spezifisch bindendes Analoges des Liganden ist irgend eine Substanz oder Gruppe von Substanzen, die sich in Beziehung auf die Bindungsaktivität zu dem spezifisch bindenden Partner zu dem Liganden im wesentlichen genauso verhält wie der Ligand.

Das spezifisch bindende Reagens kann irgend eine verschiedener Formen annehmen. Im allgemeinen umfaßt ein solches Mittel drei grundlegende Bestandteile und zwar (1) den nachzuweisenden Liganden, (2) einen spezifisch bindenden Partner des Liganden und (3) einen markierten Bestandteil der üblicherweise die markierte Form von (a) dem Liganden, (b) einem spezifisch bindenden Analogem des Liganden oder (c) dem spezifischen Bindungspartner ist. Die Bestandteile der Bindungsreaktion werden gleichzeitig oder in einzelnen Stufen zusammengegeben und innerhalb einer geeigneten Inkubationszeit oder -zeiten wird der markierte Bestandteil an seinen entsprechenden konkurrierenden Bindungspartner gebunden, so daß das Ausmaß der Bindung, d.h. das Verhältnis der Menge an markiertem Bestandteil, die an den Bindungspartner gebunden ist, zu der ungebundenen Menge eine Funktion der Menge des vorhandenen Liganden ist. Später sind einige unterschiedliche Bindungsreaktionsschemata angegeben, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens angewandt werden können.

Während bei den üblichen heterogenen spezifischen Bindungsbestimmungsverfahren, wie den radioimmunologischen Bestimmungen und heterogenen Enzyme-verwendenden immunologischen Bestimmungsverfahren die Markierungseigenschaften in dem markierten Konjugat, wie die Radioaktivität oder enzymatische Aktivität im wesentlichen gleich sind für die

gebundenen und freien Formen des Konjugats wird erfindungsgemäß die Aktivität des Reagenses als Markierungssubstanz * beeinflusst durch die Bindung des markierten Konjugats. In einer solchen Situation zeigt die Nachweisreaktion einen verhältnismäßig konstanten Charakter, wenn der Ligand in dem flüssigen Medium nicht vorhanden oder in einer unbedeutend kleinen Menge vorhanden ist. Wenn der Ligand in dem flüssigen Medium vorhanden ist, wird ein Charakteristikum oder eine Eigenschaft der Nachweisreaktion verändert. Allgemein ist die Aktivität des konjugierten Reagenses das Ausmaß oder die Geschwindigkeit, mit der das Reagens imstande ist, an der Nachweisreaktion teilzunehmen. So wird der Charakter der Nachweisreaktion verändert durch das Vorhandensein des Liganden in dem flüssigen Medium, üblicherweise entweder in Beziehung auf die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit oder die Menge an einem oder mehreren Reaktionsprodukten, die im Gleichgewichtszustand vorhanden sind. Üblicherweise wird in einem solchen Falle die Fähigkeit des konjugierten Reagenses, an der Nachweisreaktion teilzunehmen, durch Reaktion zwischen der spezifisch bindenden Substanz, mit der es konjugiert ist, und einem spezifisch bindenden Partner einer solchen spezifisch bindenden Substanz verringert, d.h. das Konjugat ist in freier Form reaktionsfähiger in der Nachweisreaktion als in gebundener Form.

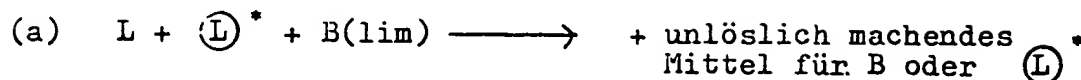
*in bestimmten Fällen

In den folgenden Diagrammen werden die folgenden Symbole und Abkürzungen verwendet:

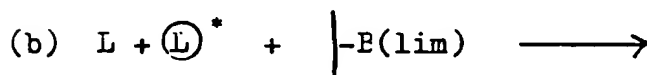
<u>Symbol</u>	<u>Definition</u>
L	nachzuweisender Ligand
Ⓐ	Ligand oder spezifisch bindendes Analoges dazu
B	Bindungspartner für den Liganden
*	Markierungssubstanz, d.h. Reagens
└	unlösliche Phase
→	Inkubationszeit und anschließende Trennung
(lim)	limitiert; in einer Menge vorhanden, die geringer ist als diejenige, die von den gesamten bindenden Stellen unter den Reaktionsbedingungen während der angewandten Inkubationszeit gebunden werden kann, d.h. der Bestandteil, um den die anderen Bestandteile in Konkurrenz treten, um mit ihm Bindungen einzugehen
(exc)	Überschuß; in einer Menge vorhanden, die größer ist als diejenige, die imstande ist, von den gesamt-verfügbaren bindenden Stellen unter den Reaktionsbedingungen während der angewandten Inkubationszeit gebunden zu werden

Schemata für heterogene Bestimmungen

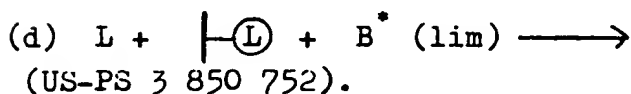
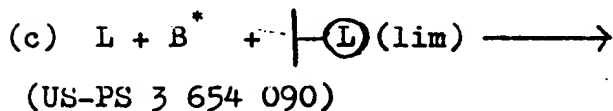
1. Konkurrenzbindungsreaktionen



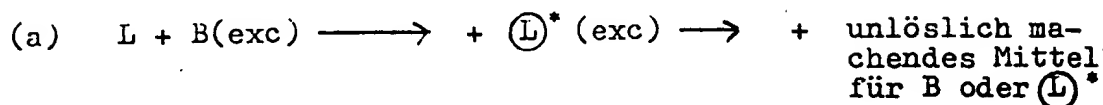
Das ist das klassische Schema einer Konkurrenzbindungsreaktion. Beispiele für die unlöslich machenden Mittel sind spezifische ausfällende Antikörper, spezifische unlöslich gemachte Antikörper und, wenn B oder $(\textcircled{L})^*$ ein proteinartiges Material ist, proteinausfällende Substanzen, wie Ammoniumsulfat, oder wenn B oder $(\textcircled{L})^*$ ein kleines adsorbierbares Molekül ist, mit Dextran überzogene Aktivkohle. Ähnliche Systeme sind beschrieben in Biochem. J. 88, 137 (1963) und US-PS 3 839 153.



Diese Reaktion wird allgemein als Festphasen-Verfahren (solid-phase technique) bezeichnet. Die Beschreibung ähnlicher radioimmunologischer oder enzymatischer immunologischer Bestimmungsverfahren findet sich in US-PS 3 505 019, 3 555 143, 3 646 346 und 3 654 090.



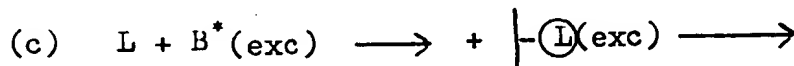
2. Aufeinanderfolgende Sättigungsverfahren



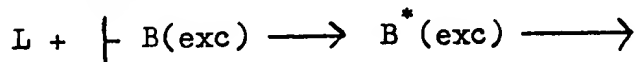
Bei dem aufeinanderfolgenden Sättigungsverfahren (sequential saturation technique) werden einige oder alle bindenden Stellen von B, die nach der ersten Inkubationszeit noch verbleiben, durch den markierten Bestandteil gebunden.



Beschreibungen ähnlicher radioimmunologischer und enzymatisch immunologischer Bestimmungsverfahren finden sich in US-PS 3 720 760 und J.Immunol. 209, 129 (1972).

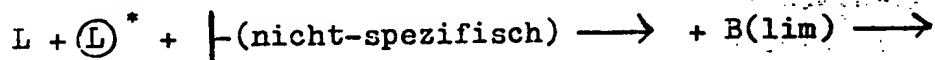


3. "Sandwich"-Verfahren



Bei dem "Sandwich"-Verfahren werden einige oder alle Ligandenmoleküle an die unlöslich machenden Bindungspartner über den markierten Bestandteil gebunden (US-PS 3 720 760).

4. Festphasen-Verdünnungsverfahren



Bei diesem Verfahren werden der Ligand und der markierte Bestandteil an eine nicht-spezifische Substanz gebunden und anschließend proportionale Mengen durch Bindung mit einem Bindungspartner mit einer größeren Affinität zu dem Liganden und den markierten Bestandteil abgespalten.

Bei der günstigsten Form dieses Verfahrens wird eine Säule eines nicht-spezifischen bindenden Mittels angewandt (US-PS 3 659 104). Ein solches Verfahren ist geeignet, wenn der Ligand in der Probe an endogene bindende Substanzen gebunden ist, die, wenn sie nicht entfernt werden, bei der Konkurrenz-Bindungsreaktion stören würden. Nach der Bindung an das nicht-spezifische Bindungsmittel können die endogenen bindenden Substanzen durch entsprechendes Auswaschen entfernt werden.

Bezüglich der weiteren Diskussion von Parametern, die bei üblichen heterogenen Bestimmungsverfahren eine Rolle spielen sowie die mehr ins einzelne gehende Beschreibung von Bestimmungsverfahren und alternativen Trennverfahren wird auf Principles of Competitive Protein-Bindung Assays, Herausg. Odell und Daughaday (J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1972) verwiesen.

Im Rahmen der Erfindung ist es auch möglich, andere Verfahrensarten anzuwenden, wie andere Reihenfolgen der Zugabe und andere Bindungsreaktionstechniken zur Durchführung von heterogenen spezifischen Bindungsbestimmungen.

Die Bestimmung der Aktivität des konjugierten Reagenses als Bestandteil des vorher bestimmten Nachweisreaktionssystems entweder in der gebundenen oder in der freien Phase wird bequem erreicht, indem man diese Phase mit mindestens einer Substanz zusammenbringt, die mit dem konjugierten Reagens die Nachweisreaktion bildet und ein Charakteristikum dieser Reaktion mißt. Das Nachweisreaktionssystem kann eine einzelne chemische Umwandlung oder eine Vielzahl oder Reihe von chemischen Umwandlungen umfassen.

609845/1072

Wenn ein enzym-katalysiertes Reaktionssystem angewandt wird, umfaßt es neben dem konjugierten Reagens mindestens ein Enzym und kann auch ein oder mehrere enzymatische Reagentien, wie Substrate und Coenzyme umfassen.

Ein derartiges enzymkatalysiertes Reaktionssystem kann eine einzelne einfache enzymatische Reaktion oder eine komplexe Reihe von enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktionen umfassen. Z.B. kann das enzymkatalysierte Reaktionssystem aus einem einzigen enzymkatalysierten Abbau oder einer Dissoziationsreaktion bestehen.

In einem solchen System ist das konjugierte Reagens das Enzymsubstrat, das abgebaut oder dissoziiert wird und die einzige Komponente des Reaktionssystems, die mit der gebundenen oder freien Phase in Berührung gebracht werden muß, ist ein Enzym, das den Abbau oder die Dissoziationsreaktion katalysiert. Ein komplexeres enzymkatalysiertes Reaktionssystem kann aus einer einzelnen enzymatischen Reaktion bestehen, umfassend zwei oder mehrere Reaktionsteilnehmer, oder es kann aus einer Reihe von Reaktionen bestehen, umfassend verschiedene Reaktionsteilnehmer, von denen mindestens eine Reaktion enzymkataly-

siert ist. In einem solchen System wäre das konjugierte Reagens einer der enzymatischen Reaktionsteilnehmer der enzymkatalysierten Reaktion und die gebundene oder feste Phase würde mit dem entsprechenden Enzym und den anderen Komponenten der Reaktion außerdem Konjugat zusammengebracht, die erforderlich sind, um das gewünschte enzymkatalysierte Reaktionssystem zu ergeben.

Das enzymkatalysierte Reaktionssystem kann ferner ein biochemisches System umfassen, das so komplex ist wie das Stoffwechselsystem einer biologischen Zelle, wie eines Mikroorganismus. Z.B. kann eine Nährsubstanz, die für das Wachstum eines speziellen Mikroorganismus wesentlich ist, als Reagens in dem Konjugat angewandt werden.

Die Aktivität des Reagenses würde zu einer Änderung der Wachstumseigenschaften des Mikroorganismus wie der Geschwindigkeit führen, wenn ein solcher Mikroorganismus in eine Umgebung gebracht werden würde, in der die einzige Quelle für die Nährsubstanz das Konjugat ist.

Die entsprechenden Reaktionsbestandteile, die zusammen mit dem Reagens in dem Konjugat das Nachweisreaktionssystem bilden, können mit dem Gemisch der abgetrennten Phase einzeln oder in irgend einer Kombination vorher, gleichzeitig oder anschließend an die ^{Auslösung der} spezifischen Bindungsreaktion zusammengebracht werden. Nach Beginn der spezifischen Bindungsreaktion wird das Reaktionsgemisch, das irgend eine oder alle der erforderlichen Bestandteile für die Nachweisreaktion enthalten kann, üblicherweise eine vorher-bestimmte Zeit inkubiert, bevor eine Änderung der Aktivität des Reagenses in dem Konjugat

bestimmt wird. Nach der Trennung werden irgendwelche Bestandteile, die für die Nachweisreaktion erforderlich sind und die nicht schon in ausreichenden Mengen in dem Reaktionsgemisch vorhanden sind, zugegeben, und eine Wirkung auf die Nachweisreaktion bestimmt als Zeichen für das Vorhandensein oder die Menge des Liganden in dem flüssigen Medium.

Wenn die Reaktionsgeschwindigkeit der Nachweisreaktion das Charakteristikum ist, das angewandt

wird, um die Reaktionsfähigkeit der gebundenen oder freien* wie es bevorzugt ist, wird eine derartige Geschwindigkeit üblicherweise bestimmt durch Messung der Geschwindigkeit, in der ein Reaktionspartner verschwindet oder der Geschwindigkeit, mit der ein Reaktionsprodukt auftritt. Eine derartige Messung kann durch viele verschiedene Verfahren durchgeführt werden, wie die üblichen chromatographischen, gravimetrischen, potentiometrischen, spektrophotometrischen, fluorometrischen, Trübungsmessungen und volumetrischen Bestimmungen. Da das erfindungsgemäße Verfahren in erster Linie bestimmt ist zum Nachweis geringer Konzentrationen an Liganden, wurden sehr empfindliche Reaktionssysteme entwickelt zur Anwendung im Zusammenhang mit dem neuen spezifischen Bindungsreaktionssystem. Eine bevorzugte Form der Nachweisreaktion umfaßt ein Lumineszenzreaktionssystem, vorzugsweise ein enzymkatalysiertes, wie eine Reaktion, die Biolumineszenz oder Chemilumineszenz ergibt. Das Reagens in dem Konjugat kann entweder ein Reagens in der lichterzeugenden Reaktion sein oder in einer Reaktion, die einer enzymatischen oder nicht-enzymatischen Lumineszenzreaktion vorausgeht.

Die Aktivität des konjugierten Reagenses kann bestimmt werden durch Messung der

Geschwindigkeit der Lichtbildung oder der Gesamtmenge, Spitzenintensität oder dem Charakter des entstehenden Lichtes. Beispiele für Lumineszenzreaktionssysteme sind in Tabelle A angegeben, bei der die folgenden Abkürzungen angewandt werden:

ATP	Adenosintriphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
NAD	Nicotinamidadenin-dinucleotid

*Phase zu bestimmen,

609845/1072

NADH reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
FMN Flavinmononucleotid
FMNH₂ reduziertes Flavinmononucleotid
hν elektromagnetische Strahlung, üblicherweise
 im IR-, sichtbaren oder UV-Bereich.

TABELLE A:

T A B E L L E A

Lumineszens-Reaktionssystem

konjugiertes Reagens

- A. $\text{ATP} + \text{reduziertes Luciferin} \xrightarrow[\text{(Leuchtkäfer)}]{\text{Luciferase}} h\nu + \text{AMP} + \text{oxidiertes Luciferin}$ ATP oder reduziertes Luciferin
- B. $\text{FMNH}_2 + \text{langkettiger Aldehyd} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{(P. fisheri)}]{\text{Luciferase}} \text{FMNH}_2 \text{ oder langkettiger Aldehyd}$
- $h\nu + \text{FMN} + \text{langkettige Säure} + \text{H}_2\text{O}$
- C. 1) $\text{NADH} + \text{FMN} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{NADH Dehydrogenase}} \text{NAD} + \text{FMNH}_2$ NADH oder FMN
- 2) $\text{FMNH}_2 + \text{langkettiger Aldehyd} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{(P. fisheri)}]{\text{Luciferase}}$
- $h\nu + \text{FMN} + \text{langkettige Säure} + \text{H}_2\text{O}$
- D. 1) $3',5'\text{-Adenosin-diphosphat} + \text{reduziertes Luciferin-sulfat} \xrightarrow[\text{Sulfat-trans-ferase}]{\text{Sulfat-trans-ferase}}$ 3',5'-Adenosindiphosphat oder reduziertes Luciferin
- $\rightarrow \text{Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat} + \text{reduziertes Luciferin}$
- 2) $\text{reduziertes Luciferin} + \text{O}_2 \longrightarrow h\nu + \text{oxidiertes Luciferin}$

609845/1072

2618419

Forts. zu

TABELLE A

Lumineszens-Reaktionssystem

konjugiertes -
Reagens

Peroxidase *

reduziertes Luminol

$h\nu$ + oxidiertes Luminol + H_2O

E. reduziertes Luminol + H_2O_2

Peroxidase *

reduziertes Pyrogallol

$h\nu$ + oxidiertes Pyrogallol + H_2O

F. reduziertes Pyrogallol + H_2O_2

Oxygenase

reduziertes Luminol

$h\nu$ + oxidiertes Luminol

G. reduziertes Luminol + O_2

Oxygenase

reduziertes Pyrogallol

$h\nu$ + oxidiertes Pyrogallol

H. reduziertes Pyrogallol + O_2

Lactoperoxidase

Isoluminol

$h\nu$ + Aminophthalat + N_2

I. Isoluminol + H_2O_2

Lactoperoxidase

Isoluminol

$h\nu$ + Aminophthalat + N_2

J. Isoluminol + KO_2

* oder Catalase

2618419

609845/1072

Weitere Einzelheiten und Diskussionen bezüglich von Lumineszenzreaktionssystemen, die für das erfindungsgemäße Verfahren angewandt werden können, sind angegeben in:

J. Biol. Chem. 236:48(1961).

J. Amer. Chem. Soc. 89:3944 (1967).

Cornier et al., Bioluminescence in Progress,
Ed. Johnson et al., Princeton University
Press (New Jersey, 1966), S. 363 - 84.

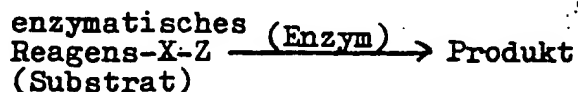
Kries, P. Purification and Properties of Renilla
Luciferase, doctoral thesis University of
Georgia (1967).

Am. J. Physiol. 41:454 (1916).

Biol. Bull. 51:89 (1926).

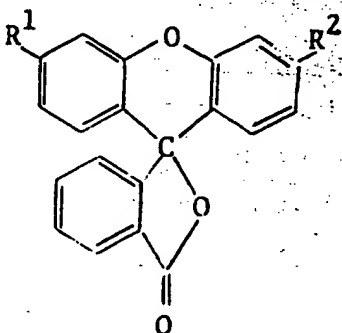
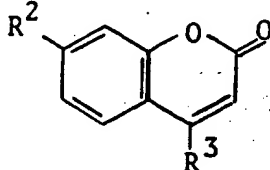
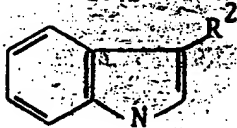
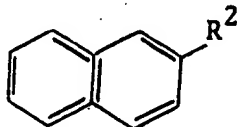
J. Biol. Chem. 243:4714 (1968).

Eine andersartige bevorzugte empfindliche Nachweisreaktion umfaßt das Phänomen der Fluoreszenz und ist enzymkatalysiert. Bei einem solchen Reaktionssystem ist das Reagens in dem Konjugat ein Substrat für eine enzymatische Reaktion, die ein Produkt liefert, das Fluoreszenzeigenschaften besitzt, die es von dem konjugierten Substrat unterscheiden. Jede auftretende Änderung in der Aktivität des konjugierten enzymatischen Reagenses, die durch die spezifische Bindungsreaktion bewirkt wird, führt zu einer Änderung in den Fluoreszenzeigenschaften des Reaktionsgemisches. Ein allgemeines Reaktionsschema für eine derartige enzymkatalysierte Reaktion ist das folgende:

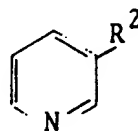


wobei X eine enzymatisch spaltbare Bindung oder Bindungsgruppe ist, wie eine Ester- oder Amidogruppe und Z eine

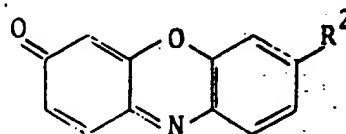
spezifisch bindende Substanz, die in Abhängigkeit von der angewandten spezifischen Bindungsreaktion der Ligand, ein spezifisch bindendes Analoges des Liganden oder ein spezifisch bindender Partner des Liganden ist. Spezifische Konjugate, die für ein derartiges Reaktionssystem angewandt werden können, sind verschiedene durch Enzym spaltbare Derivate von Fluorescein, Umbelliferon, 3-Indol, β -Naphthol, 3-Pyridol, Resorufin, usw.; Beispiele für mögliche Strukturformen derartiger Derivate sind:

<u>Derivat</u>	<u>Formel</u>
Fluorescein	
Umbelliferon	
3-Indol	
β -Naphthol	

3-Pyridol



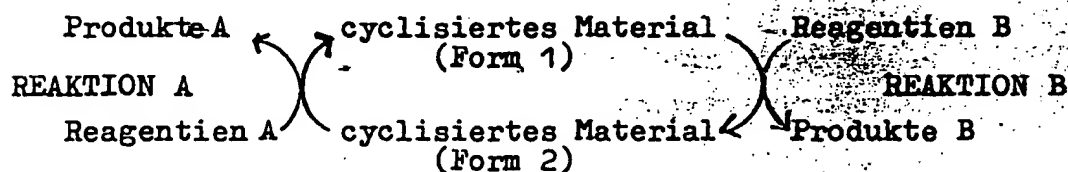
Resorufin



wobei R^1 -OH oder -X-Z (wie oben angegeben), R^2 -X-Z und R^3 -H oder -CH₃ ist.

Ein Reaktionssystem, das besonders bevorzugt ist zur Bestimmung der Aktivität des konjugierten Reagenses in der* ein cyclisches Reaktionssystem (Ringreaktion). Bei einem derartigen Reaktionssystem wird ein Produkt einer ersten Reaktion in einer zweiten Reaktion umgesetzt, wobei in der zweiten Reaktion ein Produkt entsteht, das auch ein Reagens für die erste Reaktion ist.

Das folgende Diagramm zeigt ein Modell für ein derartiges cyclisches Reaktionssystem:



Bei dem oben angegebenen Modell eines cyclischen Reaktionssystems bildet eine kleine Menge des cyclisierten Materials, wenn ihr ausreichende Mengen der Reaktionspartner A und B zur Verfügung stehen, große Mengen an Produkten A und B. Da die Reaktionsgeschwindigkeit und Menge an Produkten, die

*ausgewählten Phase ist

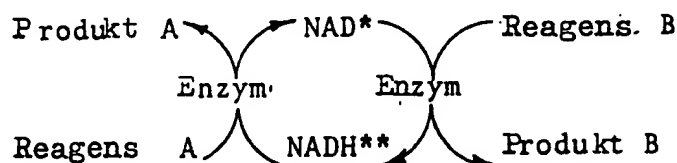
609845/1072

durch die Reaktionen/^{entstehen} die das cyclische Reaktionssystem bilden, sehr empfindlich sind gegenüber

der vorhandenen Menge an cyclisi rtem Material, ist es besonders bevorzugt, dieses cyclisierte Material als Reagens in dem erfindungsgemäßen Konjugat zu v rwenden. Beispiele für cyclische Reaktionssysteme, die im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen spezifischen Bindungsreaktionssystem angewandt werden können, sind in den folgenden Tabellen B, C und D angegeben.

TABELLE B und C:

T A B E L L E B

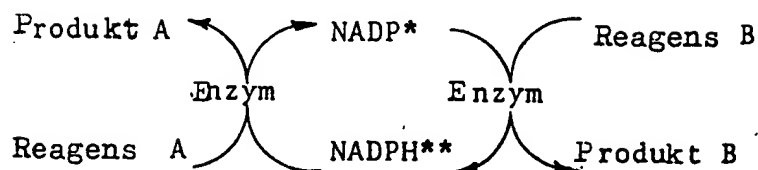


<u>Reaktion</u>	<u>Reagens A oder Produkt B</u>	<u>Enzym</u>	<u>Reagens B oder Produkt A</u>
1	Lactaldehyd	Alkohol-dehydro- genase	Propandiol
2	α -Ketoglutarat + NH_3	Glutaminsäure- dehydrogenase	Glutamat
3	Oxaloacetat	Äpfelsäure- dehydrogenase	Malat
4	Acetaldehyd	Alkoholdehydro- genase	Äthanol
5	α -Ketoglutarat + CO_2	Isocitronen- säure-dehydro- genase	Isocitrat
6	Dehydroxyaceton- phosphat	α -Glycerin- phosphat- dehydrogenase	L- α -Glycerin- phosphat
7	Pyruvat	Milchsäure- dehydrogenase	Lactat
8	1,3-Dephospho- glycerat	Glyceraldehyd- 3-phosphat- dehydrogenase	Glyceraldehyd- 3-phosphat + Phosphat

* Nicotinamid-adenin-dinucleotid

** reduziertes NAD

T A B E L L E C



Reaktion	Reagens A oder Produkt B	Enzym	Reagens B oder Produkt A
1	6-Phosphogluconat	Glucose-6- phosphat- dehydrogenase	Glucose-6- phosphat
2	oxidiertes Glutathion	Glutathion- reductase	reduziertes Glutathion
3	p-Benzochinon	Chinon- reductase	Hydrochinon
4	Nitrat	Nitrat- reductase	Nitrit
5	α-Ketoglutarat + NH ₃	Glutamin- säure- dehydrogenase	Glutamät

* Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat

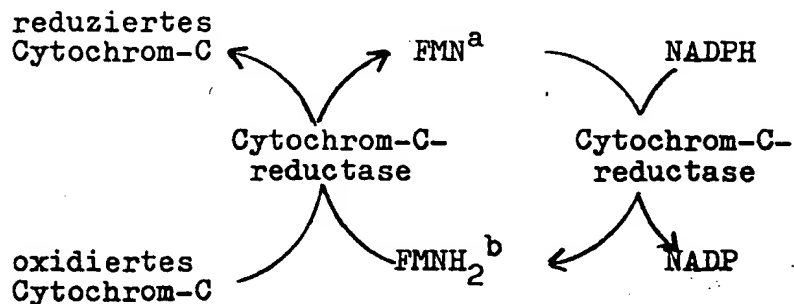
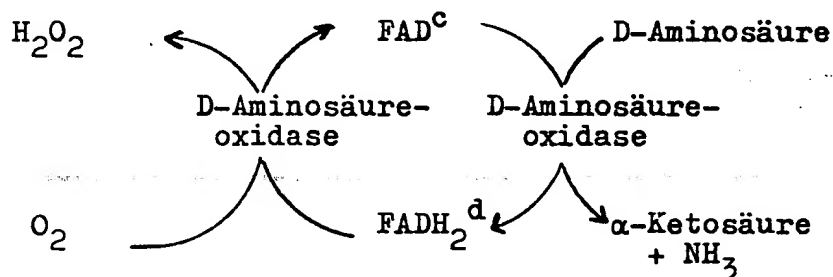
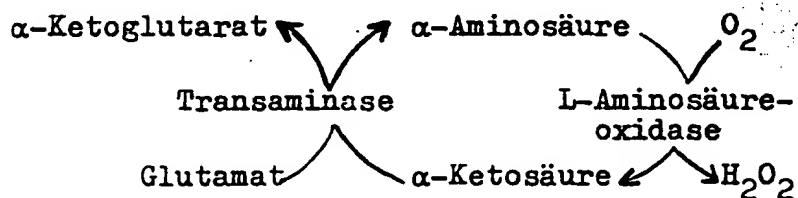
** reduziertes NADP

Es ist zu bemerken, daß die in den Tabellen B und C angegebenen cyclischen Reaktionssysteme eine Kombination irgend einer der in den jeweiligen Tabellen angegebenen Reaktionen mit einer anderen dort angegebenen Reaktion umfaßt. Z.B. kann die Reaktion 1 in Tabelle B mit irgend einer der Reaktionen 2 bis 9 kombiniert werden, um ein geeignetes cyclisches Reaktionssystem zu ergeben. So geben die Tabellen B und C 56 bzw. 20 mögliche Reaktionssysteme für das erfindungsgemäße Verfahren an.

Neben den in den Tabellen B und C angegebenen cyclischen Reaktionssystemen ist es möglich, daß eine der Reaktionen in dem cyclischen Reaktionssystem die enzymatische oder nicht-enzymatische Umwandlung eines spektrophotometrischen Indikators umfaßt, vorzugsweise kolorimetrisch.

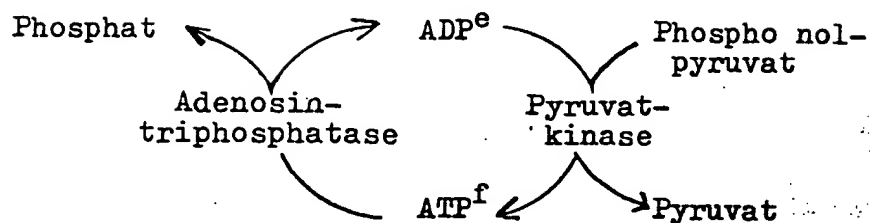
Ein Beispiel für ein cyclisches Reaktionssystem, umfassend eine Änderung eines Indikators, ist das System, das gebildet wird durch Kombination der Reagenses B Produkt B Reaktionen in Tabelle B mit einer Reaktion, umfassend einen Oxidations-Reduktions-Indikator und ein elektronenübertragendes Mittel. Als elektronenübertragendes Mittel kann Phenazinmethosulfat angewandt werden. Geeignete Indikatoren umfassen die oxidierten Formen von Nitrotetrazolium, Thiazoylblau und Dichlorphenolindophenol.

TABELLE D:

T A B E L L E D^a Flavin-mononucleotid^b reduziertes FMN^c Flavin-adenin-dinucleotid^d reduziertes FAD

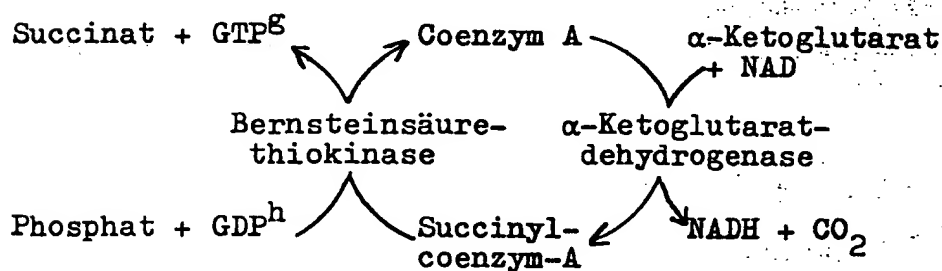
Forts. zu

T A B E L L E D



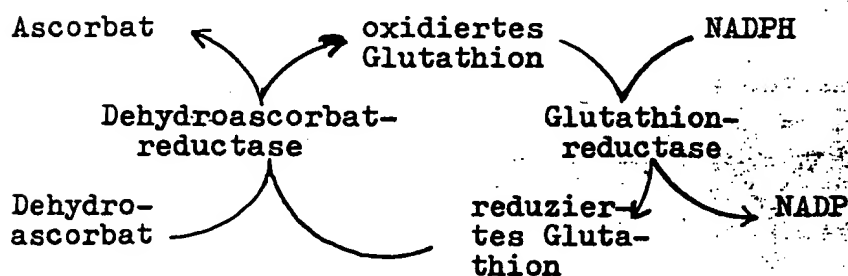
^eAdenosin-diphosphat

^fAdenosin-triphosphat



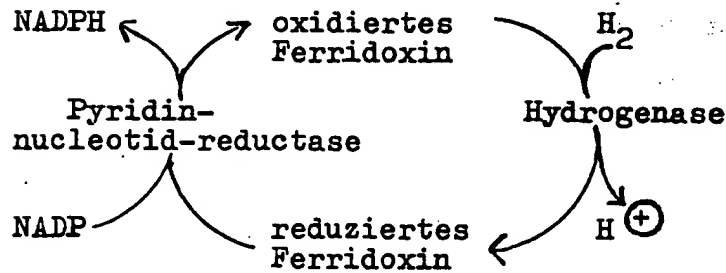
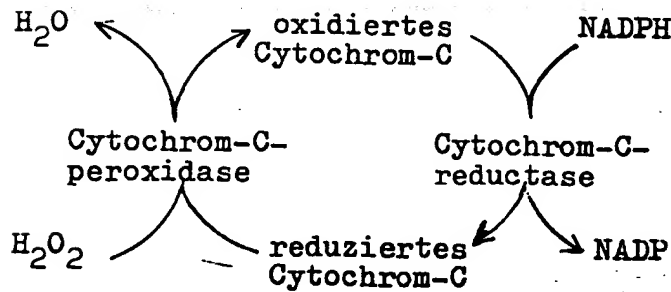
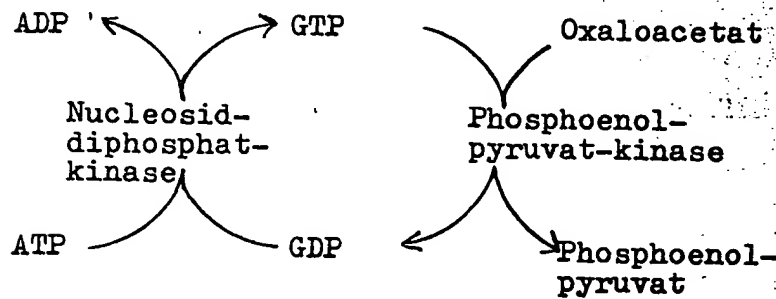
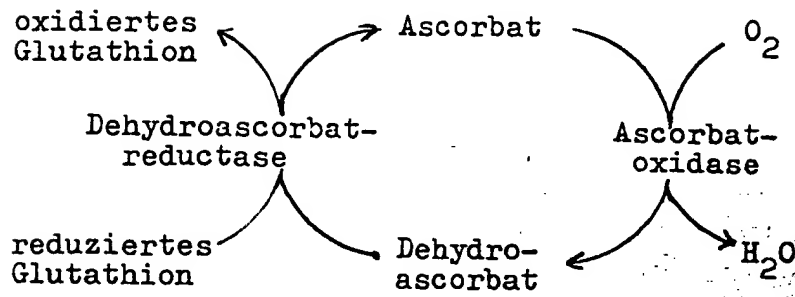
^gGuanosin-triphosphat

^hGuanosin-diphosphat



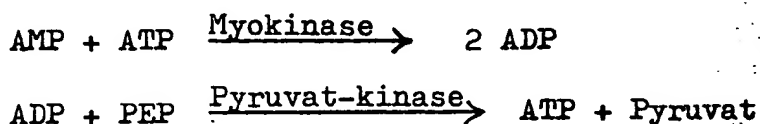
Forts. zu

T A B E L L E D



Bei Bildung irgend eines der in den Tabellen B, C und D angegebenen cyclischen Reaktionssysteme, wenn eine der Komponenten des Reaktionssystems in ionischer Form vorliegt, kann sie natürlich in Form des Salzes oder der Säure vorliegen, wenn diese bei Berührung mit dem flüssigen Medium ionisieren. Ein wasserlösliches Salz oder eine Säure ist natürlich bevorzugt.

Es kann auch ein exponentiales cyclisches Reaktionssystem bei der Nachweisreaktion angewandt werden. Ein Beispiel für ein exponentiales cyclisches Reaktionssystem ist das folgende:



Eine solche cyclische Reaktion ist autokatalytisch in dem Sinne, daß während jedes Cyclus die Menge an zurückgeführtem (cyclisiertem) Material verdoppelt wird. Die Cyclisierungsgeschwindigkeit nimmt daher exponential mit der Zeit zu und ergibt eine sehr hohe Empfindlichkeit. Weitere Einzelheiten und eine nähere Diskussion bezüglich derartiger cyclischer Reaktionen findet sich in J. Biol. Chem. 247, 3558-70 (1972).

Wenn ein cyclisches Reaktionssystem angewandt wird als Mittel zur Bestimmung der Aktivitätsänderung des konjugierten Reagenses, kann die Geschwindigkeit, mit der ein Reagens verschwindet oder ein Reaktionsprodukt auftritt, durch übliche Verfahren bestimmt werden oder mit Hilfe eines oder mehrerer cyclischer Systeme und anschließende übliche Bestimmung der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit.

Die Anwendung eines cyclischen Reaktionssystems in Verbindung mit dem heterogenen System der spezifischen Bindungsreaktion ergibt eine breite Anwendbarkeit sowie hohe Empfindlichkeit. Ein einziges Konjugat aus Reagens und spezifisch bindender Substanz kann für eine Vielzahl von Reaktionen angewandt werden, um cyclische Systeme zu bilden mit Empfindlichkeiten, die über einen weiten Bereich variieren und zu einer Vielzahl von Umwandlungen die mit Hilfe der Sinne oder künstlicher Mittel nachgewiesen werden können. Eine derartige vielseitige Anwendbarkeit besitzen bekannte Bestimmungssysteme nicht.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann angewandt werden auf den Nachweis irgend eines Liganden, zu dem es einen spezifisch bindenden Partner gibt. Der Ligand ist üblicher-

weise ein Peptid, Protein, Kohlenhydrat, Glycoprotein, Steroid oder ein anderes organisches Molekül, so daß es einen spezifisch bindenden Partner in biologischen Systemen gibt oder ein solcher synthetisiert werden kann. Der Ligand wird - allgemein gesprochen - ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Antigenen und Antikörpern dazu, Haptenen und Antikörpern dazu, Hormonen, Vitaminen, Metaboliten (Stoffwechselprodukten) und pharmakologischen Mitteln und ihren Rezeptoren und bindenden Substanzen. Spezifische Beispiele für Liganden, die erfindungsgemäß nachgewiesen werden können, sind Hormone, wie Insulin, Choriogonadotropin, Thyroxin, Liothyronin und Ostriol, Antigene und Haptene, wie Ferritin, Bradykinnin, Prostaglandine und tumorspezifische Antigene, Vitamine, wie Biotin, Vitamin B₁₂, Folsäure, Vitamin E und Ascorbinsäure, Metaboliten, wie 3',5'-Adenosinmonophosphat und 3',5'-Guanosinmonophosphat, pharmakologische Mittel, wie Dilantin, Digoxin, Morphin, Digitoxin und Barbiturate, Antikörper, wie mikrosome Antikörper und Antikörper gegen Hepatitis und Allergene und spezifisch bindende Rezeptoren, wie thyroxinbindendes Globulin, Avidin, Intrinsicfaktor und Transcobalamin.

609845/1072

Bei dem erfindungsgemäßen Konjugat ist das Reagens an eine spezifisch bindende Substanz gekuppelt oder gebunden, die der Ligand, ein spezifisch bindendes Analoges des Liganden oder ein spezifisch bindender Partner des Liganden ist, je nach dem ausgewählten Bestimmungsverfahren, so daß eine meßbare Menge an Aktivität des Reagens erhalten bleibt. Die Bindung zwischen dem Reagens und der spezifisch bindenden Substanz ist üblicherweise im wesentlichen unter den Bestimmungsbedingungen irreversibel, wobei die Nachweisreaktion, in der das Reagens Aktivität besitzt, nicht so gestaltet ist, um eine solche Bindung chemisch zu zerstören, wie bei dem oben erwähnten Lumineszenz- und cyclischen Reaktionssystem. In einigen Fällen wird jedoch eine solche Bindung (by design) zerstört oder auf andere Weise angegriffen durch die ausgewählte Nachweisreaktion als Mittel zur Bestimmung der Reagensaktivität. Ein solcher Fall liegt vor bei dem oben erwähnten enzymatischen Fluoreszenz-Substrat-Reaktionssystem.

Das Reagens kann direkt an die spezifisch bindende Substanz gekuppelt sein, so daß das Molekulargewicht des Konjugates geringer ist als oder gleich so groß ist wie das Gesamt-

molekulargewicht des Reagenses der spezifisch bindenden Substanz. Üblicherweise sind jedoch das Reagens und die spezifisch bindende Substanz über eine Brückengruppe, enthaltend 1 bis 50, vorzugsweise 1 bis 10 Kohlenstoffatom oder Heteroatome, wie Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphoratome usw. miteinander verbunden. Beispiele für eine Brückengruppe, umfassend ein einziges Atom, ist die Methyl^{en}gruppe (ein Kohlenstoffatom) und die Aminogruppe (ein Heteroatom). Die Brückengruppe besitzt üblicherweise ein Molekulargewicht von nicht mehr als 1 000 und vorzugsweise weniger als 200. Die Brückengruppe umfaßt eine Kette von Kohlenstoffatomen oder Heteroatomen oder eine Kombination von beiden und ist mit dem Reagens und der spezifisch bindenden Substanz oder einem aktiven Derivat davon über eine verbindende Gruppe gebunden, üblicherweise in Form einer Ester-, Amido-, Äther, Thioester-, Thioäther-, Acetal-, Methylen- oder Aminogruppe.

Das Reagens in dem erfindungsgemäßen Konjugat kann irgend eine Substanz sein mit einer vorgegeben (d.h. fixierten oder bekannten) Reaktionsfähig^{keit} als Bestandteil einer vorher festgelegten Nachweisreaktion. Besonders bezeichnen im Rahmen dieser Beschreibung die Ausdrücke "Reagens" und "Substanz mit Reaktionsfähig^{keit}" irgend eine chemische Substanz, die imstande ist, am Ende eine meßbare chemische Umwandlung einzugehen, die ein oder mehrere Produkte liefert, die sich von der Substanz unterscheiden und die, nachdem eine Wechselwirkung oder Reaktion zwischen diesem Reagens und den die Reaktion einleitenden Mitteln, wie einer chemischen Substanz (d.h. einem anderen Reagens, einem Katalysator oder einer anderen Substanz, die in einer solchen chemischen Umwandlung teilnimmt), elektromagnetischer Strahlung, thermischer Energie oder Schallenergie auftritt. Die Gruppe von Substanzen, die hier als "Reagentien" bezeich-

net werden, umfaßt übliche anorganische und organische Reagentien und verschiedene biochemische Substanzen, aber nicht Substanzen, wie Katalysatoren, einschließlich Enzymen und radioaktiven Isotopen, die keine Reagentien bzw. Reaktionspartner für die Nachweisreaktion darstellen. Es ist zu bemerken, daß, während eine spezielle chemische Substanz in verschiedene Kategorien eingeordnet werden kann, da sie imstande ist, in verschiedener Weise zu wirken, je nach der chemischen Umgebung, es die Aktivität einer solchen Substanz gegenüber der ausgewählten Nachweisreaktion ist, die bestimmt, was für eine funktionelle Identität eine solche Substanz im Zusammenhang mit der Erfindung besitzen soll.

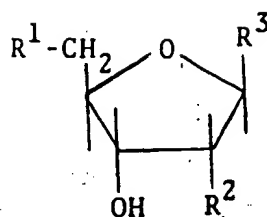
Vorzugsweise ist das Reagens ein enzymatisches Reagens, wie ein Enzymsubstrat, ein Coenzym oder eine aktive Modifikation oder ein Derivat davon. Ein Enzymsubstrat ist eine Verbindung oder Gruppe, die imstande ist, eine chemische Umwandlung einzugehen, die durch ein Enzym katalysiert wird. Wenn ein Substrat als konjugiertes Reagens angewandt wird, beträgt das bevorzugte Molekulargewicht vorzugsweise weniger als 9 000 und besonders weniger als 5 000. Substrate solcher Größe sind aufgrund ihres Mangels an Molekularkomplexität besonders bequem für die Herstellung eines solchen Konjugats.

Beispiele für

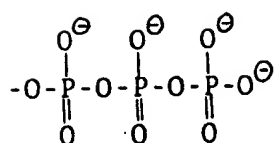
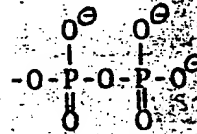
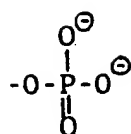
Enzymsubstrate, die für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind, umfassen die enzymatisch spaltbaren Fluoreszenzsubstrate, die oben erwähnt sind, wie Fluorescein und Umbelliferonderivate, pH-Indikatoren und spektrophotometrische Indikatorfarbstoffe, besonders chromogene Farbstoffe.

Aus den oben angegebenen Gründen und aus Gründen der Anwendbarkeit und Anpaßbarkeit sind Coenzyme als Reagentien für die erfindungsgemäßen Konjugate besonders geeignet. Ein Coenzym ist ein Nichtprotein-Molekül, das von einem Enzymprotein zu einem anderen wandert und dadurch die Wirksamkeit der katalytischen Funktion des Enzyms verbessert. Alle bekannten Coenzyme besitzen ein Molekulargewicht von weniger als 9 000. Die bevorzugten Coenzyme besitzen ein Molekulargewicht von weniger als 5 000. Geeignete Coenzyme umfassen die Nucleotidcoenzyme, besonders solche, enthaltend Adeningruppen, wie die Adenosinphosphate (d.h. die Mono-, Di- und Triphosphatformen), Nicotinamidadenindinucleotid und dessen reduzierte Formen und Nicotinamidadenindinucleotidphosphat und dessen reduzierte Formen. Andere geeignete Coenzyme umfassen die Guanosinphosphate, Flavinmononucleotid und dessen reduzierte Formen, Flavinadenindinucleotid und dessen reduzierte Formen, Coenzym A und dessen Thioester einschließlich Succinyl-Coenzym A, 3',5'-Adenosindiphosphat und Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat.

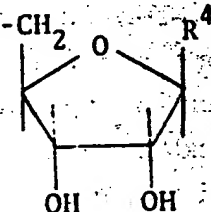
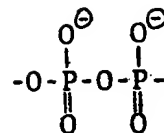
Geeignete coenzymaktive Konjugate umfassen Nucleotidcoenzyme mit einer Adeningruppe, an die die spezifisch bindende Substanz, d.h. ein Ligand, ein spezifisch bindendes Analoges des Liganden oder ein spezifischbindender Partner eines Liganden über eine direkte Bindung oder über eine Brückengruppe, wie oben angegeben, gebunden ist. Solche coenzymaktiven Konjugate, die ein Adenosinphosphat, Nicotinamidadenindinucleotid oder dessen reduzierte Form oder Nicotinamidadenindinucleotidphosphat oder dessen reduzierte Form umfassen, besitzen die folgende allgemeine Formel:



wobei $R^1 =$

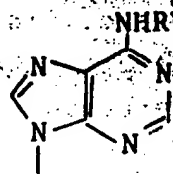
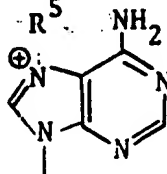
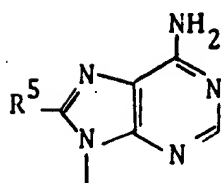


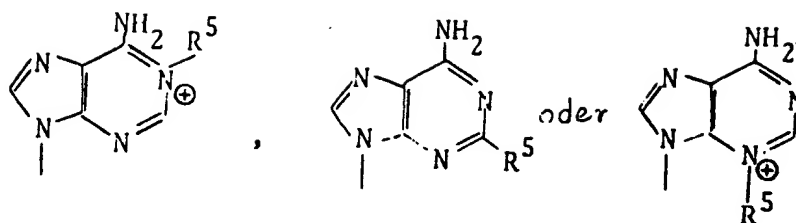
oder



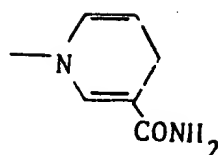
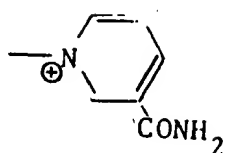
wobei $R^2 = -OH$ or $-O-P(=O)(O-)-O-$;

wobei $R^3 =$





wobei $R^4 =$

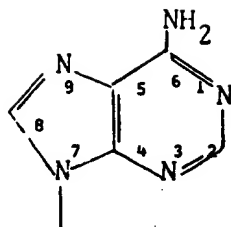


ist,

in der $R^5 = -Y-Z$ ist, wobei Y eine Bindung oder eine Brückengruppe bedeutet, und Z einen Liganden, ein spezifisch bindendes Analoges eines Liganden oder einen spezifisch bindenden Partner eines Liganden bedeutet. Die oben angegebene Formel zeigt die ionisierten Formen der coenzymaktiven Konjugate, die protonisierten oder Säureformen sind jedoch gleichermaßen geeignet. Das Ausmaß der Protonisierung hängt von dem pH-Wert der Umgebung ab. Auch die Salze derartiger Konjugate können angewandt werden. *)

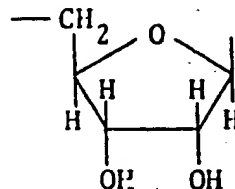
Die Synthese derartiger Verbindungen kann auf eine Vielzahl von Arten erreicht werden. Es ist möglich, daß die Synthesewege, die schematisch unten angegeben sind, vorteilhaft angewandt werden zur Herstellung der geeigneten Verbindungen. Bei den gezeigten Synthesen sind die Stellungen an dem Adeninringsystem entsprechend der folgenden Formel angegeben:

*) y ist vorzugsweise eine Brückengruppe mit einem Molekulargewicht von < 2000 , besonders < 200 und enthält besonders 1 bis 10 Kohlenstoffatome und/oder Heteroatome.

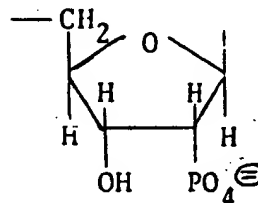


Außerdem werden die folgenden Abkürzungen angewandt:

Rib ist die Ribosegruppe:



Rib' ist die phosphatierte Ribosegruppe:



Ph ist eine Phosphatgruppe:

AP-Derivate bezeichnen Derivate von Adenosin-5'-phosphat, d.h. die Mono- (AMP), Di- (ADP) oder Tri- (ATP) phosphatform;

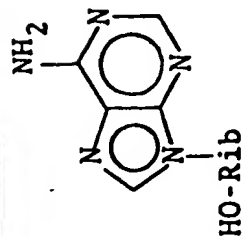
NAD-Derivat bezeichnet ein Derivat von entweder Nicotinamidadenindinucleotid oder einer reduzierten Form davon;

NADP-Derivat bezeichnet ein Derivat von entweder Nicotinamidadenindinucleotidphosphat oder einer reduzierten Form davon;

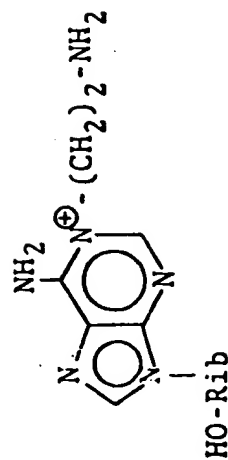
R bezeichnet eine spezifisch bindende Substanz oder eine Modifikation davon und

X bezeichnet eine austretende Gruppe, üblicherweise ein Halogenatom.

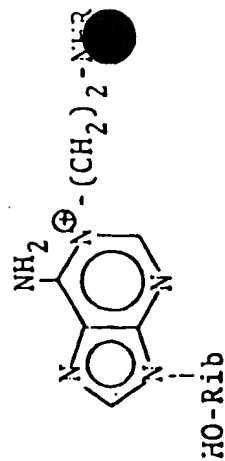
1- D e r i v a t von AP



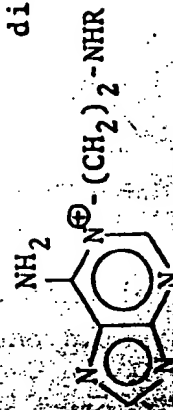
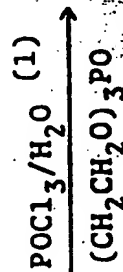
Äthylenimin
pH 6,0; 60 h



RX



Adenosin



H-Ph-Rib
ADP-Derivat

Phosphorsäure /
Carbonyl-
diimidazol

H-(Ph)₂-Rib

ADP-Derivat

Pyrophosphor-
säure / Carbonyl-
diimidazol (2)

H-(Ph)₃-Rib

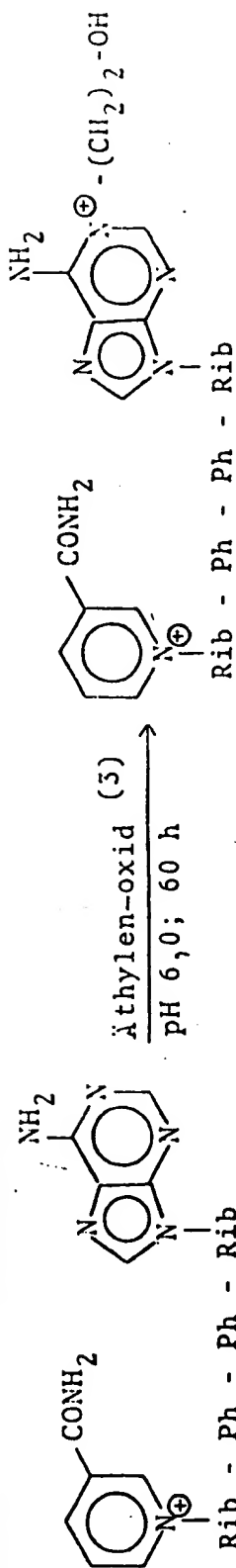
ATP-Derivat

- (1) Guilford, H., et al., *Chemica Scripta* 2:165 (1972)
(2) Trayer, I. P., et al., *Biochem. J.* 139:609 (1974)

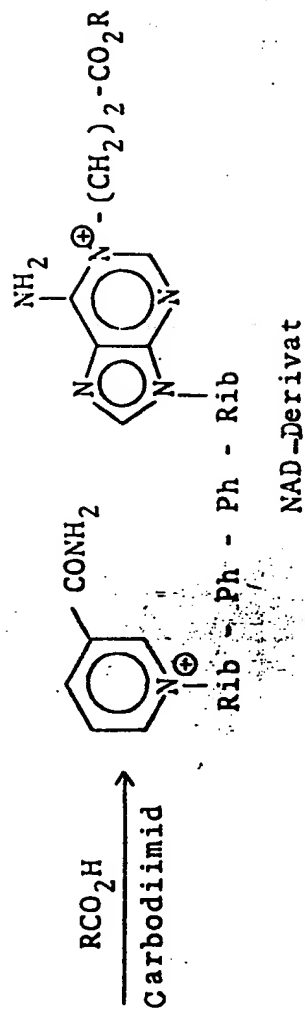
609845/1072

2618419

1-Derivat von NAD



NAD

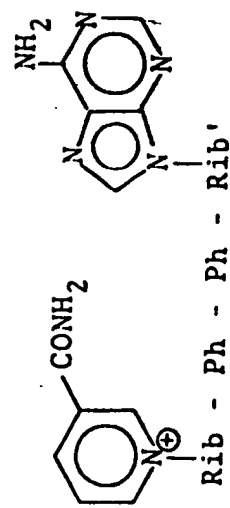


(3) Windmueller, H.G., und Kaplan, N.O., *J. Biol Chem.* 236:2716 (1961).

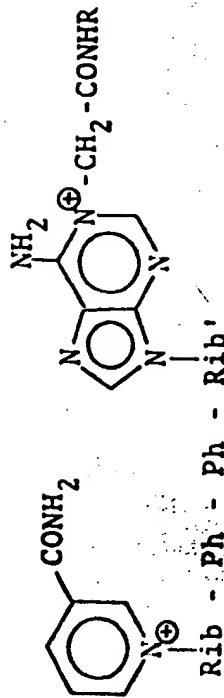
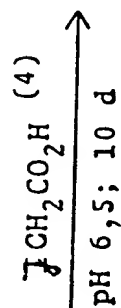
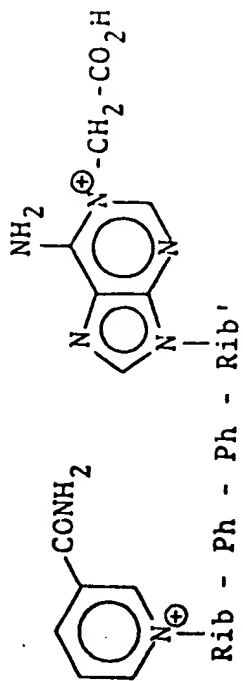
609845/1072

2618419

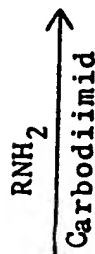
1-Derivat von NADP



NADP

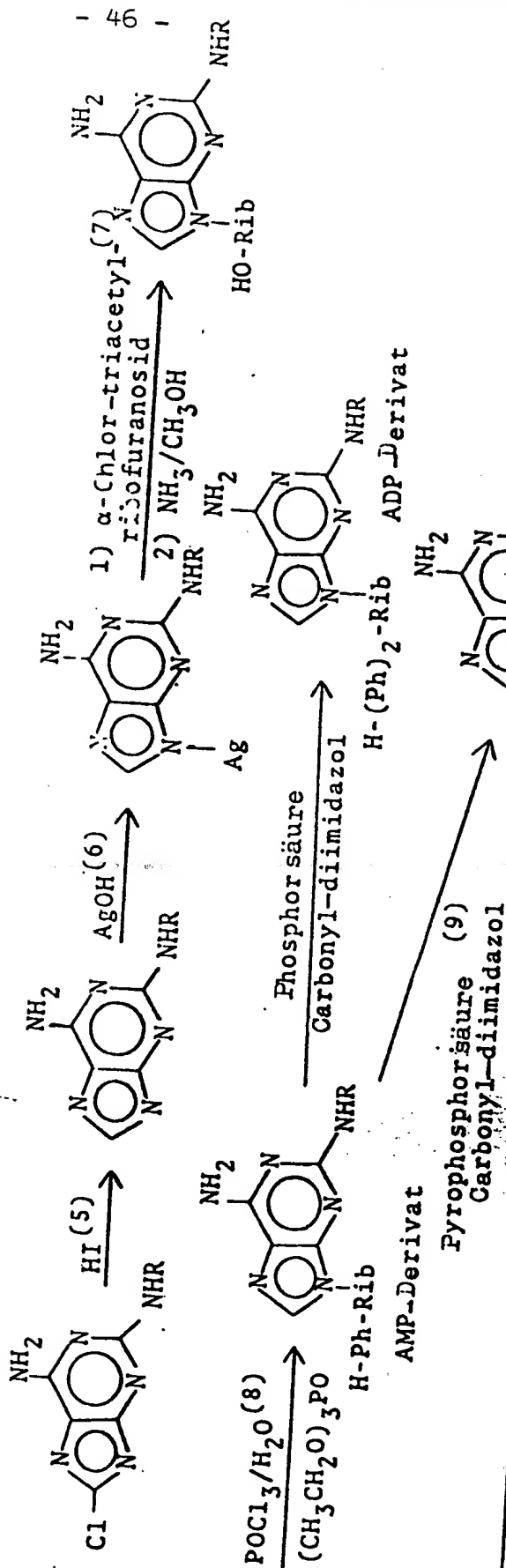
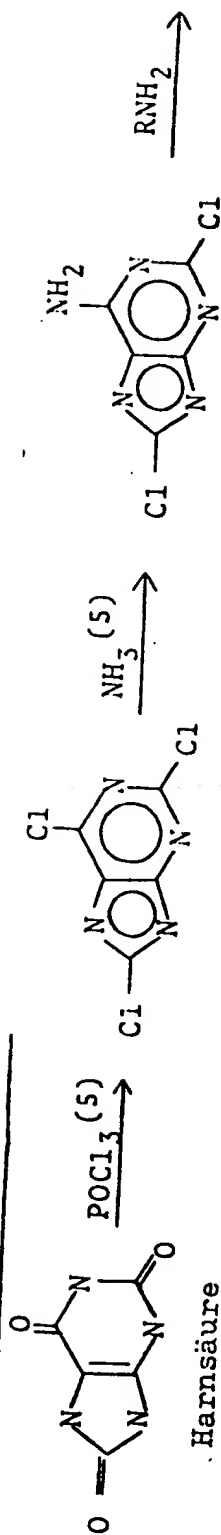


NADP-Derivat



(4) Lowe, C.R. und Mosbach, K., Eur. J. Biochem. 49:511 (1974).

2-Derivat von AP

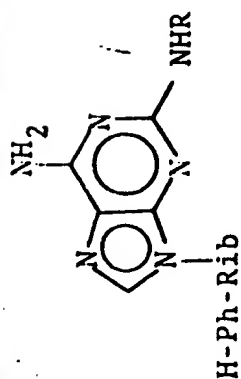


- (5) Acheson, R.M., *An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Interscience Publ. (New York 1962), S. 308.
- (6) Fischer, E., *Ber.* 30:2239 (1897).
- (7) Davoll et al., *J. Chem. Soc.*, 967 (1948).
- (8) Guilford, H., et al., *supra*.
- (9) Trayer, I.P., et al., *supra*.

609845/1072

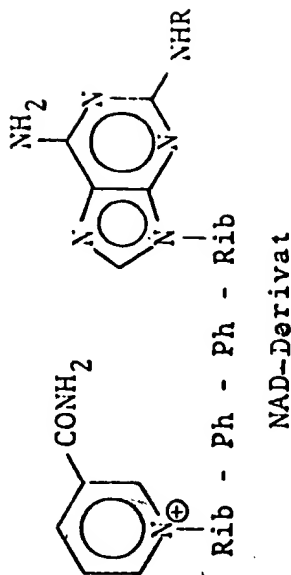
2618419

2-Derivat von NAD



AMP-Derivat

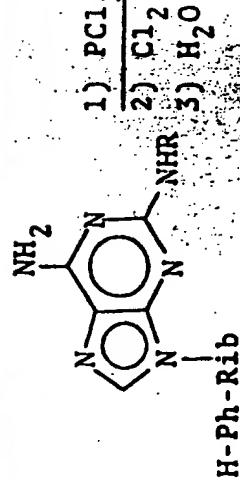
(10)
Nicotinamid
mononucleotid
Dicyclohexyl-
carbodiimid



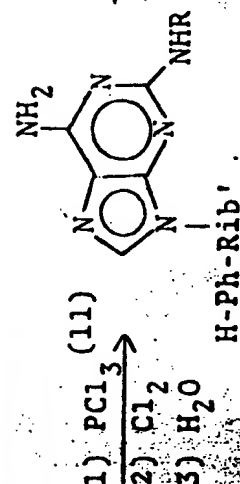
- 47 -

(10) Hughes, N.A., et al., *J. Chem. Soc.*, 3733 (1957).

2-Derivat von NADP



AMP-Derivat



H-Ph-Rib'

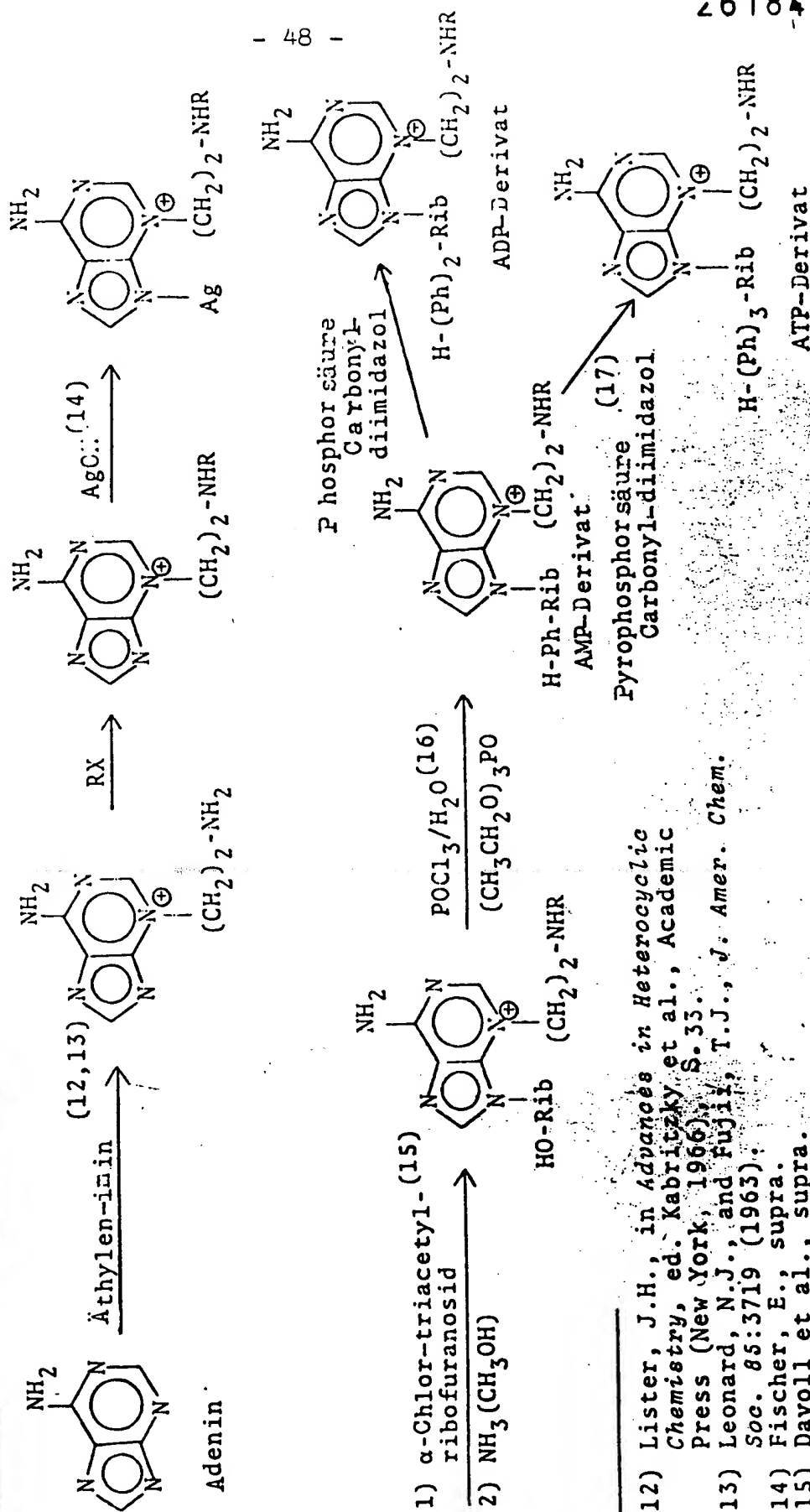
Rib - Ph - Ph - Rib'

NADP-Derivat

2618419

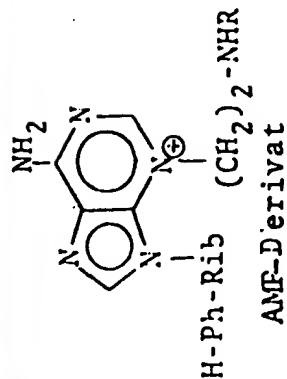
(11) Hughes, N.A., et al., *supra*.

609845/1072

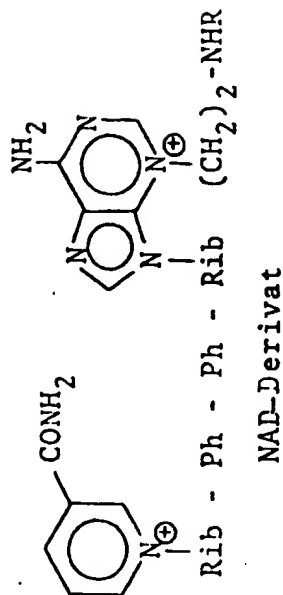


- (12) Lister, J.H., in *Advances in Heterocyclic Chemistry*, ed. Kabritsky et al., Academic Press (New York, 1966), S. 33.
- (13) Leonard, N.J., and Fujii, T.J., *J. Amer. Chem. Soc.* 85:3719 (1963).
- (14) Fischer, E., *supra*.
- (15) Davoll et al., *supra*.
- (16) Guilford, H., et al., *supra*.
- (17) Trayer, I.P., et al., *supra*.

3-Derivat von NAD

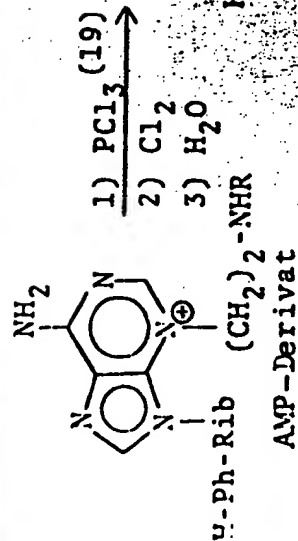


Nicotinamid-(18)
 mononucleotid
 Di cyclohexyl-
 carbodiimid

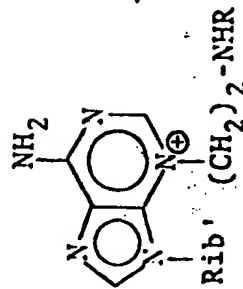


(18) Hughes, N.A., et al., supra.

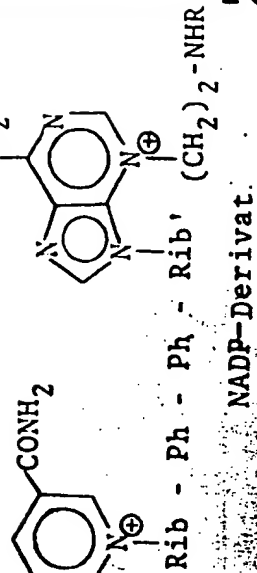
3-Derivat von NADP



1) PCl₃
 2) Cl₂
 3) H₂O

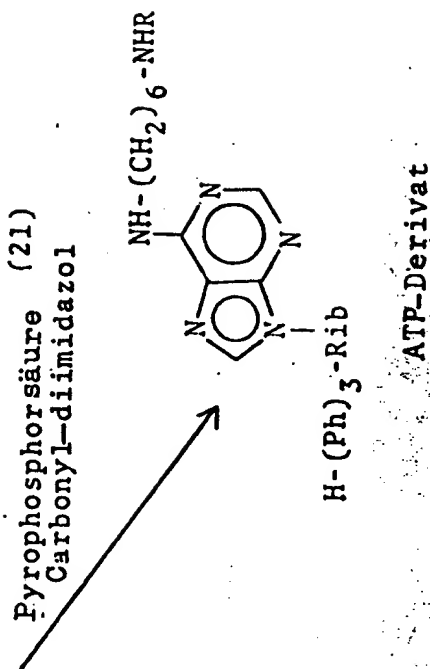
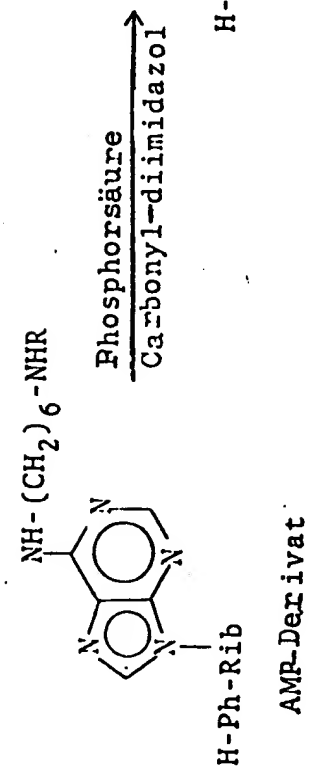
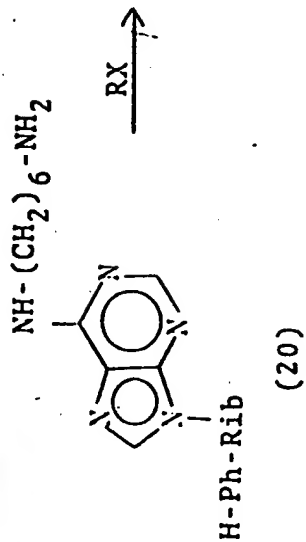


Nicotinamid-(19)
 mononucleotid
 Di cyclohexyl-
 carbodiimid



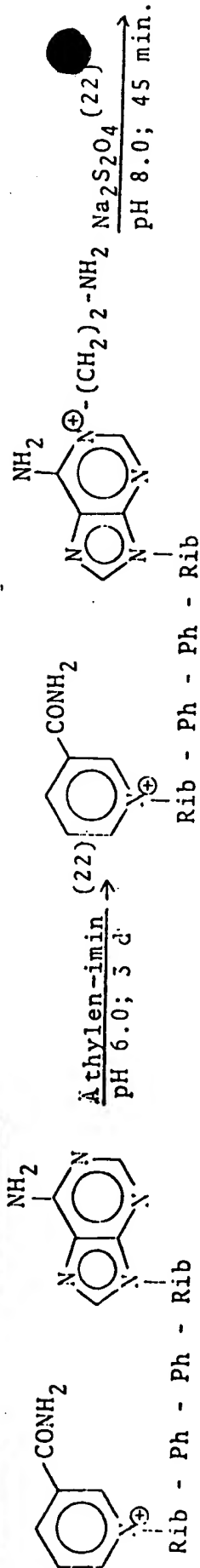
(19) Hughes, N.A., et al., supra.

6-Derivat von AP



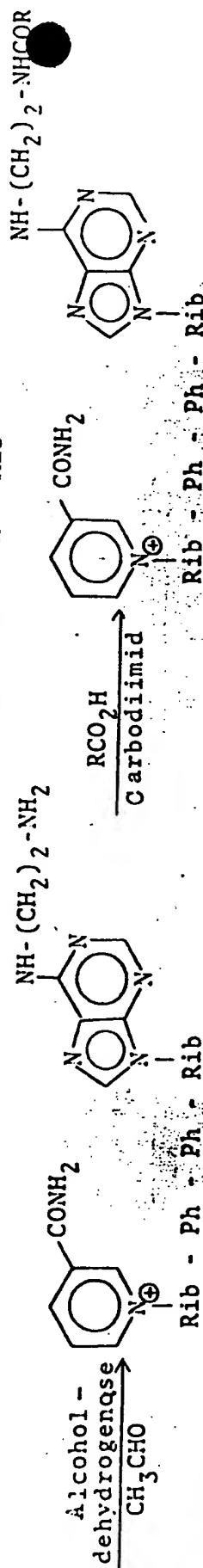
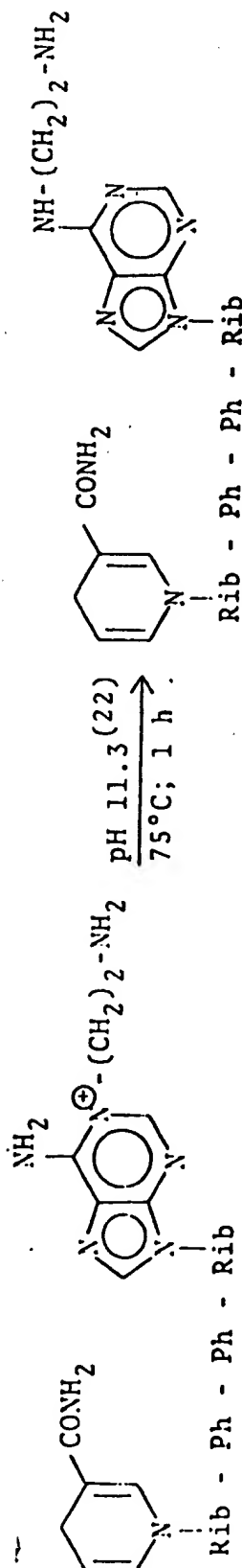
(20) Guilford, H., et al., supra.
 (21) Trayer, I.P., et al., supra.

6-D e r i v a t von. NAD



NAD

609845/1072

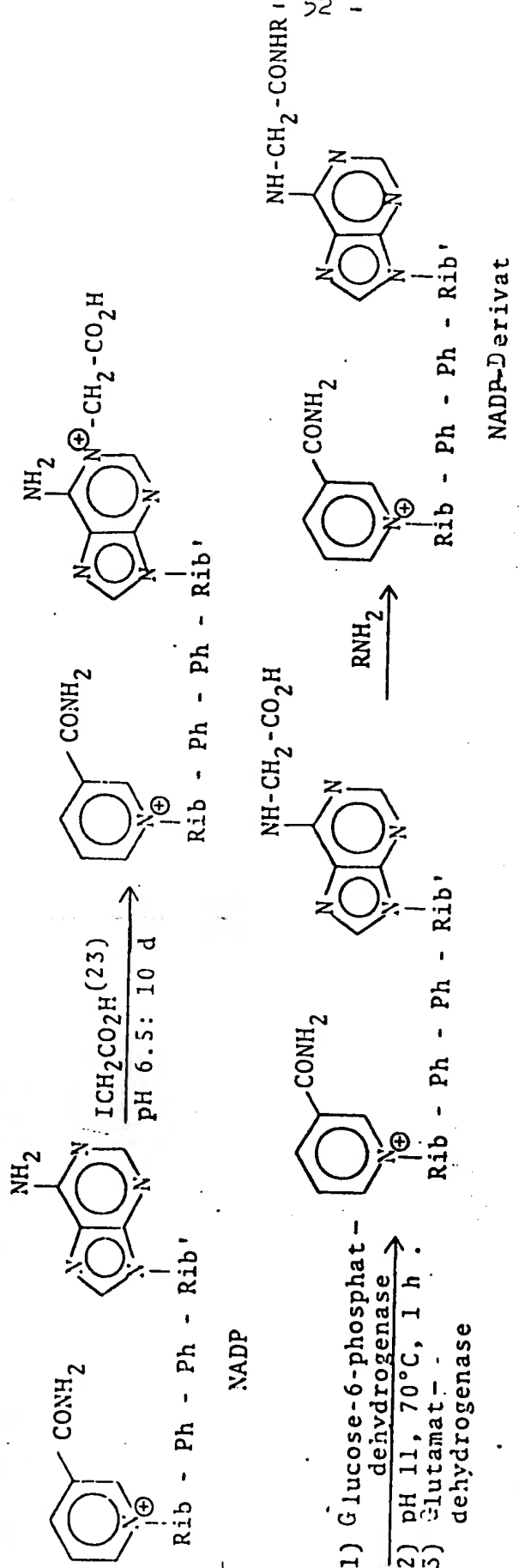


NAD-Derivat

(22) Windmueller, H.G., und Kaplan, N.O., J. Biol. Chem. 236:2716 (1961).

2618419

6-Derivat von -NADP

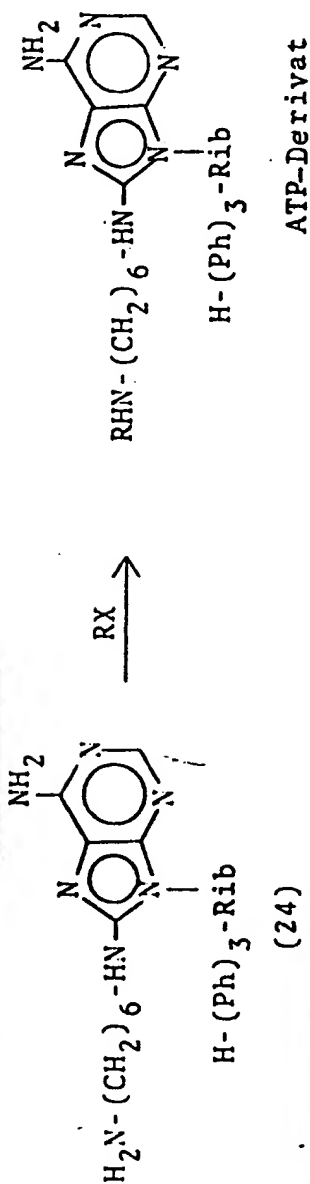


(23) Lowe, C.R., und Mosbach, K., supra.

609845/1072

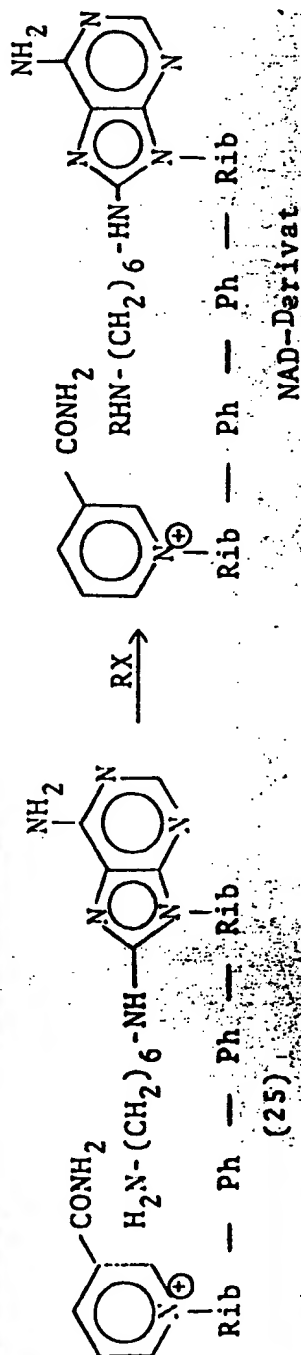
2618419

8-Derivat von AP



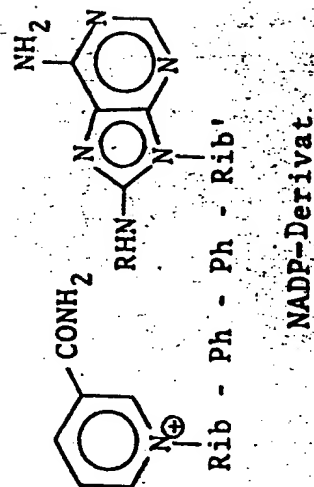
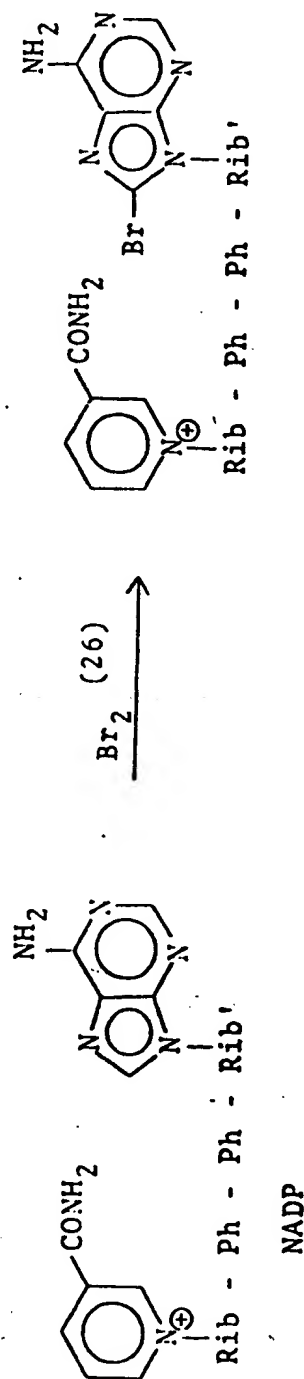
(24) Trayer, I.P., et al., supra.

8-Derivat von NAD



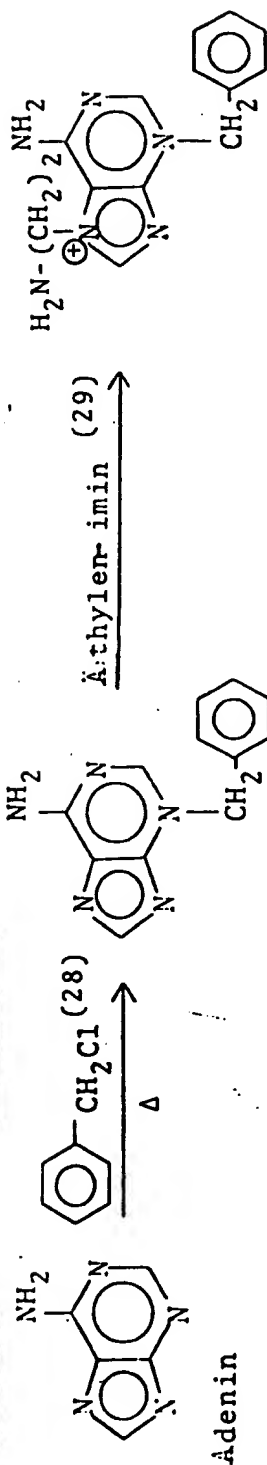
(25) Lee, C-Y, et al., Arch. Biochem. Biophys. 163:561 (1974).

8-Derivat von NADP

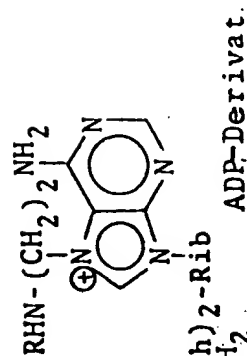
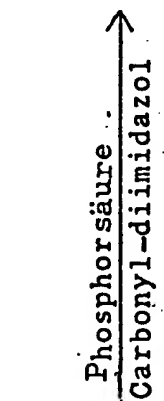
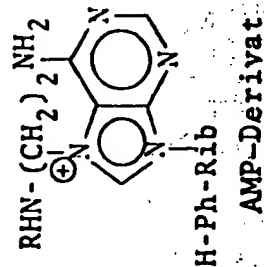
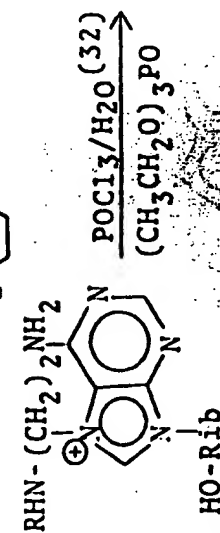
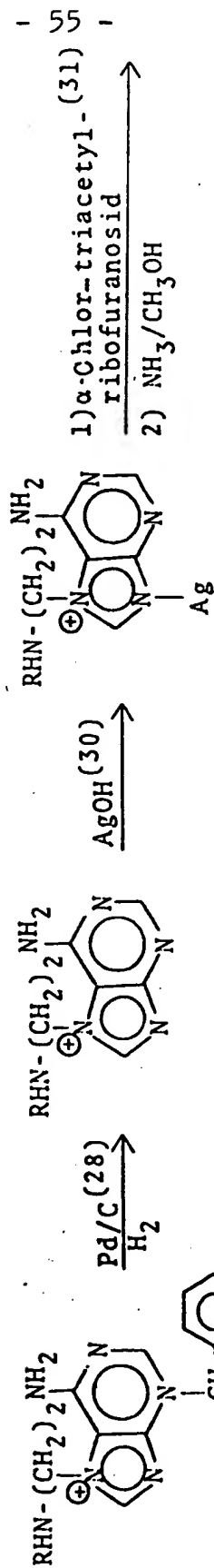


- 1) Glucose-6-phosphat-(27)
dehydrogenase
- 2) $\text{RNH}_2; \Delta$
- 3) Glutamat-
dehydrogenase

(26) Lee, C.Y., et al., supra.
(27) Lowe, C.R. und Mosbach, R., supra.



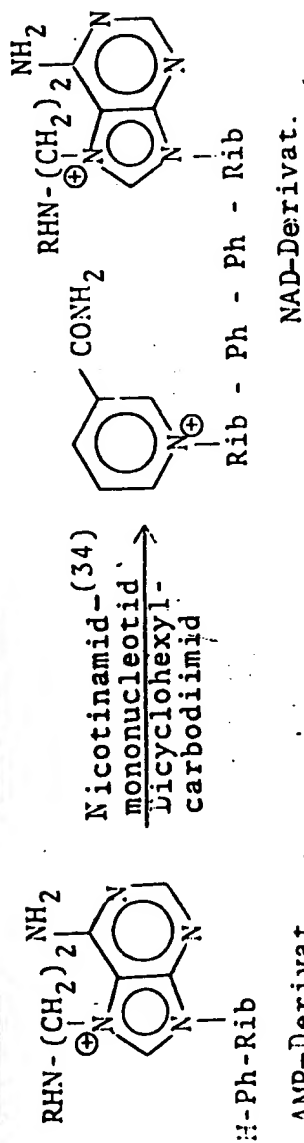
609845/1072



- (28) Leonard, N.J., supra.
- (29) Fujii, T.J., supra.
- (30) Lister, J.H., supra.
- (31) Fischer, E., supra.
- (32) Davoll, et al., supra.
- (33) Guildford, H., et al., supra.
- (34) Trayer, I.P., et al., supra.

2618419

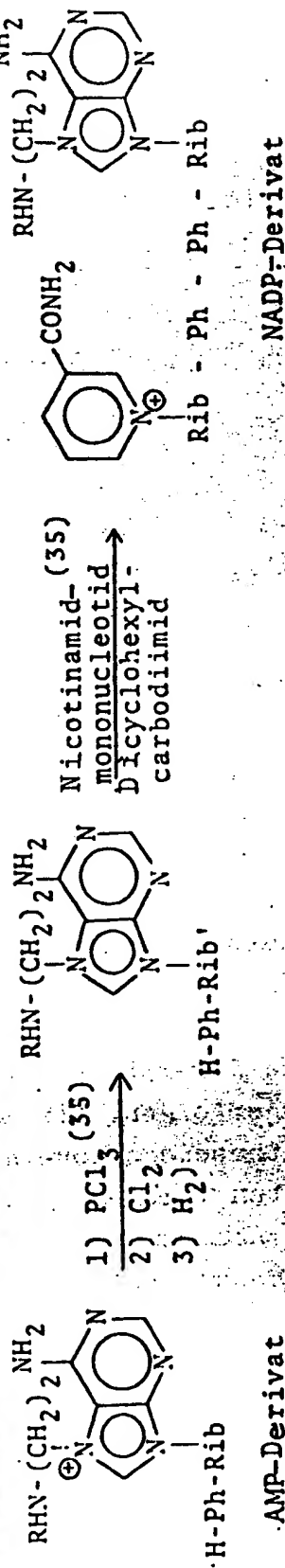
9-Derivat von NAD



AMP-Derivat

(34) Hughes, N.A., et al., supra.

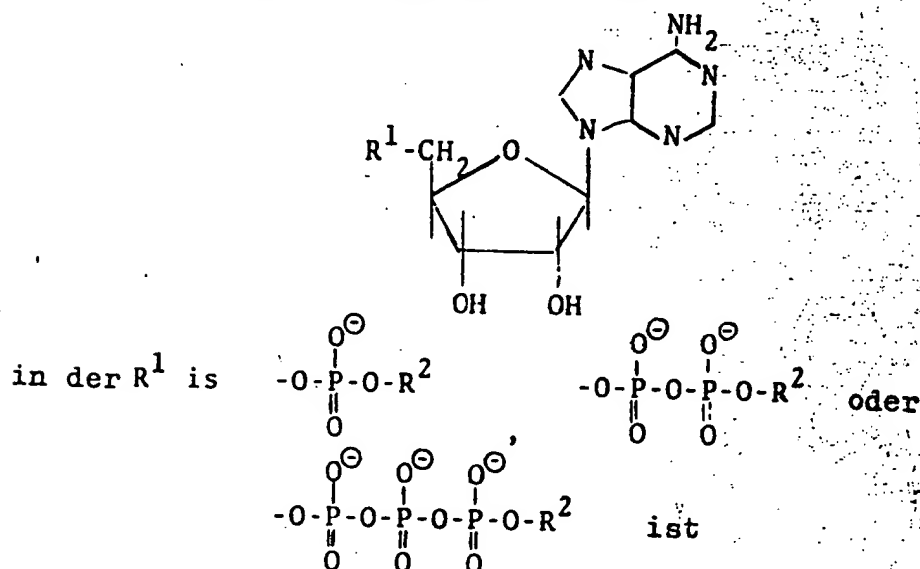
9-Derivat von NADP



AMP-Derivat

(35) Hughes, N.A., et al., supra.

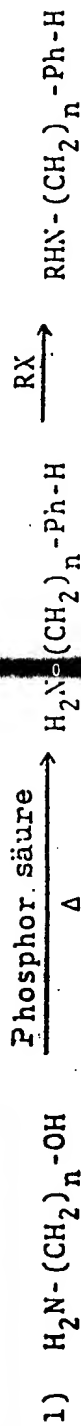
Außer den oben erwähnten Verbindungen umfassen geeignete coenzymaktive Konjugate die Adenosinphosphate, an die die spezifisch bindende Substanz über die Phosphatgruppierung gebunden ist. Derartige Verbindungen besitzen die folgende allgemeine Formel:



wobei $R^2 = -Y-Z$ ist und Y eine Bindung oder eine Brücken-
gruppe und Z ein Ligand, ein spezifisch bindendes Analoges
des Liganden oder ein spezifisch bindender Partner
eines Liganden ist. Auch die protonisierten oder Säure-
formen sowie die Salzformen können angewandt werden.

Die Synthese derartiger Verbindungen kann auf verschie-
dene Weise erfolgen. Die im folgenden schematisch ge-
zeigten Synthesewege können vorteilhaft zur Herstellung
der geeigneten Verbindungen angewandt werden. Die oben
angegebenen Abkürzungen treffen auf die folgenden
Reaktionsschemata ebenfalls zu.

Derivate von AP

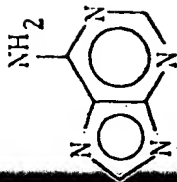


$n=1-10$

Adenosin-(36)

monophosphat

Carbonyl-diimidazol



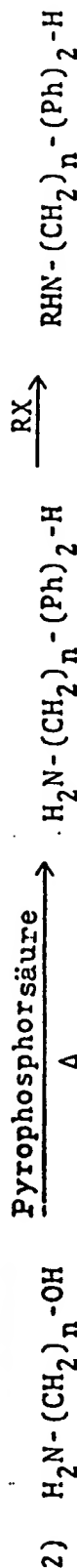
$\text{RHN}-(\text{CH}_2)_n-(\text{Ph})_2-\text{Rib}$

ADP-Derivat

(36) Trayer, I.P., et al., *Biochem. J.* 139:609 (1974).

2618419

Derivate von AP (Forts.)

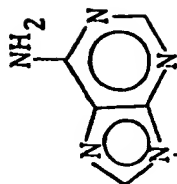


$n=1-10$

Adenosin- (37)

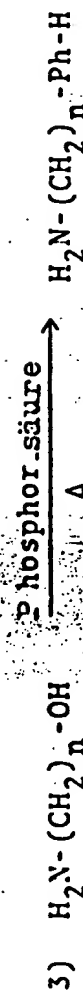
monophosphat

Carbonyl-diimidazol



$\text{RHN}-(\text{CH}_2)_n-(\text{Ph})_3-\text{Rib}$

ATP-Derivat



Adenosin
Dicyclohexyl-
carbodiimid

$\text{RHN}-(\text{CH}_2)_n-\text{Ph}-\text{Rib}$

AMP-Derivat

(37) Trayer, I.P. et al. supra.

609845/1072

2618419

Bei einer Durchführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens liegen die Komponenten der spezifischen Bindungsreaktion, die mit dem flüssigen Medium, in dem der Ligand vermutet wird, zusammengegeben werden sollen, in flüssiger oder fester Form vor. Das Bestimmungsverfahren kann in einem Standardlaborgefäß, wie einem Reagensglas, durchgeführt werden, wobei die Bestandteile der spezifischen Bindungsreaktion und die Komponenten des Reaktionssystems in fester oder flüssiger Form zugegeben werden.

Es ist auch möglich, daß eine oder mehrere der Komponenten der spezifischen Bindungsreaktion und/oder eine oder mehrere der Komponenten der Nachweisreaktion zusammen mit einem Träger zugegeben werden. Der Träger kann ein Flüssigkeitsbehälter, wie ein Reagensglas oder eine Kapsel, enthaltend eine solche Komponente oder Komponenten in einem unteren Teil, z.B. in Form einer Flüssigkeit oder eines losen Feststoffs oder eines Überzugs auf der Innenseite des Gefäßes, sein. Der Träger kann auch die Form einer Matrix besitzen, die unlöslich und porös ist und vorzugsweise in Beziehung auf das zu untersuchende flüssige Medium absorbierend ist. Eine solche Matrix kann in Form von saugfähigen Papieren, polymeren Filmen, Folien, Membranen, Flächen oder Blöcken, Gelen usw. vorliegen. Bei einer solchen Form würde das Prüfmittel bzw. die Vorrichtung ein bequemes Mittel darstellen, um das zu untersuchende flüssige Medium zur Durchführung der spezifischen

609845/1072

Bindungsreaktion und/oder der Nachweisreaktion, und ^{Durchführung der erforderlichen Trennung} zur Beobachtung der auftretenden Veränderung zusammenzubringen.

Das zu untersuchende flüssige Medium kann eine natürlich vorkommende oder künstlich hergestellte Flüssigkeit sein, von der angenommen wird, ^{oder bekannt ist} daß sie den Liganden enthält und ist üblicherweise eine biologische Flüssigkeit oder eine Flüssigkeit, die durch Verdünnung oder andere Behandlung einer solchen biologischen Flüssigkeit entsteht. Biologische Flüssigkeiten, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren untersucht werden können, umfassen Serum, Plasma, Urin und amniotische Flüssigkeit, Cerebralfüssigkeit und Spinalflüssigkeit. Andere Substanzen, wie Feststoffe, z.B. Gewebe oder Gase, können untersucht werden, indem man sie in flüssige Form überführt, z.B. durch Lösen des Feststoffs oder Gases in einer Flüssigkeit oder durch die Flüssigkeitsextraktion des Feststoffes.

Im Gegensatz zu dem bekannten ^{Bestimmungs-}system können biologische Flüssigkeiten, die Substanzen enthalten, die eine ähnliche oder identische Reagensaktivität besitzen wie diejenige der konjugierten Markierungssubstanz, auf dem Liganden untersucht werden, ohne Störung durch Hintergrundreaktionen. Endogene Hintergrund-Reagensaktivität kann leicht auf verschiedene Weise eliminiert werden. Die biologische Flüssigkeit kann behandelt werden, um die endogene Reagensaktivität selektiv zu zerstören. Eine solche Behandlung kann die Wirkung eines Klärmittels (clearing agent) umfassen, das chemisch die endogene Aktivität zerstört und anschließende Behandlung, um die zerstörende Wirkung eines solchen Klärmittels zu inaktivieren.

Z.B. kommen reagensabbauende Enzyme häufig natürlich in biologischen Flüssigkeiten vor, besonders wenn das Reagens ein Coenzym, wie NAD, NADP oder ATP ist. Es gibt viele Hemmstoffe für solche coenzymabbauenden Enzyme, z.B. Chelatierungsmittel, die so wirken, daß sie wesentliche Metallionen-Aktivatoren aus den Enzymen entfernen. Als spezielles Beispiel finden sich NAD-abbaubare Enzyme im normalen Serum und besitzen ausreichend Enzymaktivität, um im wesentlichen alle endogene NAD-Aktivität von isoliertem Serum innerhalb weniger Stunden zu entfernen. Die Abbauaktivität solcher Enzyme kann wirksam gehemmt werden durch Zugabe eines Chelatierungsmittel, wie Äthylendiamintetraessigsäure. Die Eliminierung der abbauenden Aktivität kann auch erreicht werden durch Zugabe eines spezifischen Enzymhemmstoffes. Z.B. können ATP-abbauende Enzyme gehemmt werden durch Zugabe von β -Methylen-ATP oder α, β -Methylen-ATP.

Die folgenden nicht-einschränkenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

B e i s p i e l 1

Herstellung von Nicotinamid-6-(2-aminoäthylamino)-purin-dinucleotid

2 g Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) wurden in 10 ml Wasser gelöst und 0,6 ml Äthylenimin zuge tropft und der pH-Wert durch Zugabe von 1m Perchlorsäure <7 gehalten. Nach vollständiger Zugabe des Äthylenimins wurde der pH-Wert auf 4,5 eingestellt und die Reaktion bei 20 bis 25°C inkubiert. In Intervallen von 24 h wurden 0,6 ml Äthylenimin zugegeben und der pH-Wert erneut auf 4,5 eingestellt. Nach 96 h wurde die Lösung in 10 Volumina Aceton von -10°C gegossen. Das entstehende Öl

wurde gesammelt, mit Äther gewaschen und in ungefähr 50 ml Wasser in einem Kolben gelöst.

Die entstehende Lösung wurde mit 1n Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,5 gebracht und 1 g Natriumbicarbonat zugegeben. Dann wurde 4 bis 5 min lang Stickstoff durch die Lösung geleitet und 1 g Natriumhydrosulfit zugegeben. Der Kolben wurde dicht verschlossen und 45 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Lösung wurde dann 15 min mit Sauerstoff behandelt und mit Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von 11,3 gebracht. Die Lösung wurde 1 h auf 75°C erhitzt. Dann wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt, 0,6 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan zugegeben und anschließend 5n Salzsäure, um den pH-Wert auf 7,5 einzustellen. Zu der entstehenden Lösung wurden 1 000 internationale Einheiten Alkoholdehydrogenase und 1 ml Acetaldehyd gegeben. Die Abnahme der optischen Dichte des Reaktionsgemisches wurde bei 340 nm überwacht und als keine weitere Abnahme beobachtet wurde, wurde der pH-Wert auf 3,5 eingestellt. Die Lösung wurde in 10 Volumina Aceton von -10°C gegossen. Das entstehende Öl wurde abgetrennt und mit Äther gewaschen und anschließend in 10 bis 15 ml Wasser gelöst.

Die entstehende Lösung wurde in eine 2,5 x 90 cm-Säule von Sephadex G-10 der Pharmacia AB, Uppsala, Schweden, die mit Wasser äquilibriert war, gegeben. Fraktionen von 12 ml wurden gesammelt. Die Wellenlänge der maximalen optischen Absorption im UV-Bereich und die optische Dichte bei einer derartigen Wellenlänge wurden für jede Fraktion bestimmt. Außerdem wurde die optische Dichte bei 340 nm für jede Fraktion nach Reduktion mit Alkoholdehydrogenase bestimmt. Die Fraktionen, die ein optisches Absorptionsmaximum bei 275 nm besaßen und ein Verhältnis der optischen Dichte bei 340 nm zu derjenigen bei 265 nm von mehr als

0,05 wurden zusammengegeben. Die zusammengegebenen Substanzen wurden auf 15 bis 20 ml auf einem Rotationsverdampfer eingedampft und durch eine 2,5 x 28 cm-Säule mit Dowex 1-X8 der Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, die mit Wasser äquilibriert war, gegeben. Es wurde weiteres Wasser zugegeben, um die zusammengegebenen Substanzen durch die Säule zu waschen und Fraktionen von 10 ml gesammelt. Die Fraktionen, die ein

Verhältnis von optischer Dichte bei 340 nm zu optischer Dichte bei 264 nm von mehr als 0,1 besaßen, wurden zusammengegeben.

Die zusammengegebenen Substanzen wurden durch eine 5 x 45 cm-Säule mit Dowex 50-X2 der Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien, die mit Wasser äquilibriert war, geleitet. Es wurde weiteres Wasser zugegeben und die zusammengegebenen Substanzen durch die Säule gewaschen und 20 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit einem Maximum der optischen Absorption bei 264 nm und einem Verhältnis der optischen Dichte bei 340 nm zu derjenigen bei 265 nm von mehr als 0,18 wurden zusammengegeben. Die zusammengegebenen Substanzen wurden auf 4 bis 5 ml eingeengt und folgendermaßen durch Elektrophorese gereinigt:

Die konzentrierten Substanzen wurden auf ein Blatt Whatman 3MM-Papier der Reeve Angel, Clifton, New Jersey in 1 bis 2 cm breiten Streifen senkrecht zu der Richtung des Stromes aufgebracht. Das Papier wurde dann mit 0,02m Natriumphosphat bei einem pH-Wert von 6,0 behandelt. Die Elektrophorese wurde nach dem Verfahren von Durrum mit hängendem Papier (Science 121; 829 (1955)) 4 bis 7 h mit einem Potentialgradienten von ungefähr 8,5 V/cm durchgeführt. Die Lage des gewünschten Pyridinnucleotid-

derivats wurde bestimmt durch die Fluoreszenz, die sich nach Besprühen eines Teststreifens des Papiers mit 0,5m Natriumcyanid entwickelte (J. Biol. Chem. 191, 447 (1951)). Der Bereich, der das gewünschte Derivat enthielt, wurde aus dem Papier ausgeschnitten und mit 3 x 50 ml Wasser extrahiert. Die entstehenden Auszüge, enthaltend Nicotinamid-6-(2-aminoäthylamino)purindinucleotid wurden zusammengegeben, auf 3 bis 4 ml eingengt und bei -20°C gelagert.

B e i s p i e l 2

Herstellung von Nicotinamidadenindinucleotid-Biotin-Konjugat

16 mg Biotin wurden in 1ml Wasser, enthaltend 22 mg Nicotinamid-6-(2-aminoäthylamino)purindinucleotid, entsprechend Beispiel 1, suspendiert. Zur Erleichterung der Lösung ^{des Biotins} wurden einige Tropfen 0,1n Natriumhydroxid zugegeben. Dann wurden 240 mg 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholino-äthyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat zu der entstehenden Lösung zugegeben und durch Zutropfen von 0,1n Salzsäure in Lösung gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde 5 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann in 10 ml Aceton von -10°C gegossen. Das entstehende Öl wurde abgetrennt, 2 x mit ^{5 bis 10} ml Äther gewaschen und in 1 bis 2 ml Wasser gelöst. Die entstehende Substanz wurde durch Elektrophorese auf Papier, entsprechend Beispiel 1, gereinigt. Es erschienen zwei Fluoreszenzbänder nach Besprühen mit Natriumcyanid. Das eine wanderte gegen die Kathode und das andere gegen die Anode. Das zuletzt genannte enthielt das NAD-Biotin-Konjugat und wurde mit Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

Beispiel 3

Herstellung von Biotin-Umbelliferon-Konjugat

(2-Oxo-2-H-1-benzopyran-7-yl)-5-[cis-hexahydro-2-oxo-1H-thieno-(3,4-d)-imidazol-7]valeriansäureester

Eine Lösung von 300 mg (1,2 mMol) wasserfreiem Biotin in 20 ml trockenem Dimethylformamid wurde bei -10°C unter trockenem Stickstoffgas gerührt und 0,17 ml (1,2 mMol) trockenes Triäthylamin zugegeben. Eine Lösung von frisch destilliertem Äthylchlorformiat (0,141 ml in 3 ml trockenem Äther) wurde zugetropft. Nach 30 min langem Inkubieren unter Rühren wurde der entstehende Niederschlag unter trockener Stickstoffatmosphäre abfiltriert und sofort auf -10°C gekühlt und zu dem filtrierten Rückstand wurde eine Lösung von 197 mg (1,2 mMol) wasserfreiem 7-Hydroxycumarin in 3 ml trockenem Pyridin zugegeben und 1 h bei -10°C und anschließend 20 h bei 25°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Hochvakuum bei 40°C abdestilliert. Nach dem Kühlen wurde der verbleibende Feststoff filtriert und aus Methanol umkristallisiert. Man erhielt das gewünschte Produkt. Fp. 216 bis 218°C .

Analyse:Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{P}_5\text{S}$:

Gefunden:

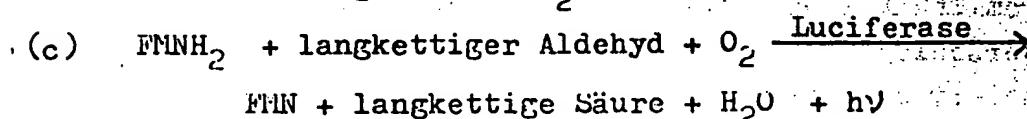
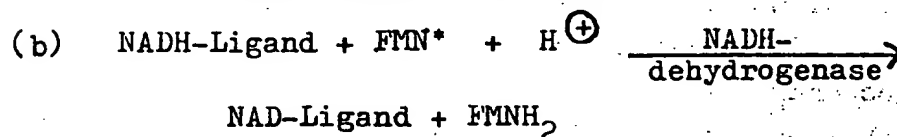
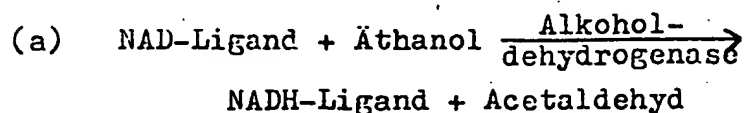
C	H	N
48,75	4,19	7,21
58,4	5,12	6,86

Beispiel 4

2618419

Bindungs-Biolumineszens-Bestimmungsverfahren
für Konkurrenz-Biotin; Wirkung verschiedener Gehalte an Biotin
auf die Spitzenlichtintensität.

Das Biolumineszens-Reaktionssystem dieses Beispiels
beruhte auf folgenden Gleichungen:



* Flavinmononucleotid

A. Herstellung einer Licht erzeugenden Lösung

Eine Licht erzeugende Lösung zur Durchführung der

Reaktionen (b) und (c) wurde folgendermaßen hergestellt. Ein Reagensgemisch wurde hergestellt, enthaltend 0,13 m Phosphatpuffer, pH 7,0, 0,67 Gew.-% Rinderserumalbumin, 15,7 µm Flavinmononucleotid (FMN), enthaltend 13,3 mm Natriumacetat und dieses Gemisch in der Dunkelheit bei -20°C aufbewahrt. Eine Emulsion von 5 µl Dodecanal in 5 µl Wasser wurde an dem Tag hergestellt, an dem die lichtentwickelnde Lösung angewandt werden sollte. Lyophilisierte Luciferase, extrahiert aus Photobacterium fisheri (Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey) wurde zu 0,013 m Phosphatpuffer, pH 7,3, bis zu einer Konzentration von 20 mg/ml zugegeben. Nach 30 min wurde die entstehende Suspension mit 1500 g 10 min zentrifugiert und die Perle verworfen. Die lichtentwickelnde Lösung wurde dann 5 min vor Anwendung hergestellt durch Zusammengeben von 75 µl des Reagensgemisches, 5 µl Dodecanal-emulsion und 20 µl Luciferaselösung.

609845/1072

2618419

B. Herstellung von unlöslich gemachtem Bindungspartner

Avidin, das eine Bindungsaffinität gegenüber Biotin besitzt, wurde unlöslich gemacht, indem es folgendermaßen kovalent an wasserunlösliche Polymerperlen gebunden wurde. Eine Menge Sepharose 4B (Pharmacia AB, Uppsala, Schweden) wurde aktiviert zur Bindung mit Avidin nach dem Verfahren von March et al, Analytical Biochemistry 60, 149 (1974). Ungefähr 4 ml der aktivierten Sepharose 4B wurden in 8 ml 0,1 M Citratpuffer, pH 7,0, suspendiert. Zu der Suspension wurden 6 mg Avidin mit einer Aktivität von 9,9 Einheiten pro mg in 3 ml Wasser zugegeben. Eine Einheit Avidinaktivität ist die Menge an Avidin, die imstande ist, 1 µg Biotin zu binden. Das entstehende Reaktionsgemisch wurde 6 h bei 7°C gerührt. Die Sepharose 4B, an die das Avidin gebunden war, wurde filtriert, mit 100 ml 0,1 M Natriumbicarbonat-Puffer, pH 9,0, gewaschen und erneut in 240 ml 0,1 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid-Puffer, pH 8,0, suspendiert.

C. Vergleichsversuche

Es wurden neun spezifische Bindungsreaktionsgemische hergestellt jeweils mit einem Gesamtvolumen von 0,19 ml und jeweils enthaltend 0,1 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid-Puffer, pH 8,0, 0,6 M Äthanol, 0,01 M Semicarbazidhydrochlorid und jeweils die in Tabelle I angegebenen Mengen bzw. Konzentrationen an NAD, NAD-Biotin-Konjugat, Suspension von an Sepharose 4B gebundenem Avidin (entsprechend Teil B dieses Beispiels) und Sepharose-4B-Suspension (hergestellt durch Suspension von 1 ml (packed) Sepharose 4B in 60 ml 0,1 M Tris-(hydroxyäthyl)aminomethanhydrochlorid-Puffer, pH 8,0). Die Reaktionsgemische wurden 15 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Dann wurden 0,22 inter-

609845/1072

1
nationale Einheiten Alkoholdehydrogenase zu jedem Reaktionsgemisch gegeben, um die Reaktionsreduktion einzuleiten. Das Semicarbazid verband sich mit dem in Reaktion (a) gebildeten Acetaldehyd unter Bildung eines Semicarbazons, wodurch die Reaktion (a) in die gewünschte Richtung geführt wurde.

Die Reaktionsgemische wurden erneut 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. 10 μ l der überstehenden Flüssigkeit jedes Reaktionsgemisches wurden dann in eine getrennte Küvette injiziert, die in einem DuPont Modell 760 Bioluminescence Photometer (E.I. duPont de Nemours, Willmington, Delaware) befestigt war und 100 μ l der vorher hergestellten lichterzeugenden Lösung enthielt, die vorher 2 bis 3 min bei 25°C inkubiert worden war. Man erhielt die in Tabelle I angegebenen Ergebnisse.

TABELLE I:

2618419

T A B E L L E I

Reaktions- gemisch	NAD-Kon- zentration (nm)	NAD-Biotin- Konjugat- Konzentration (nm)	Suspension von an Sepharose 4B Gebundenem Avidin (μ l)	Sepharose-4B- Suspension (μ l)	Spitzenlicht- intensität
1	---	---	---	---	1,2
2	21	---	---	---	159
3	21	---	20	---	147
4	---	10	---	---	45,9
5	---	21	---	---	110
6	---	21	20	---	28,5
7	21	---	---	10	154
8	---	21	---	10	114
9	---	---	20	---	1,6

609845/1072

2618419

Die Ergebnisse der Vergleichsreaktionen 1 und 9 zeigen, daß in Abwesenheit von NAD und dem NAD-Biotin-Konjugat nur sehr wenig Licht erzeugt wurde. Die Reaktionen 2 und 3 führten zu Ergebnissen, die zeigen, daß die lichterzeugende Reaktion eintrat, wenn freies NAD zugegeben wurde und daß eine derartige Reaktion im wesentlichen nicht beeinflusst wurde durch das Vorhandensein von an Sepharose 4B gebundenem Avidin. Die Ergebnisse der Reaktionen 4, 5 und 6 zeigen, daß das NAD-Biotin-Konjugat in der lichterzeugenden Reaktion aktiv war, daß die Spitzenlichtintensität zunahm, je mehr NAD-Biotin-Konjugat vorhanden war und daß das Vorhandensein von an Sepharose 4B gebundenem Avidin die Lichterzeugung hemmte. Ein Vergleich der Ergebnisse der Reaktionen 3 und 5 mit denjenigen der Reaktionen 7 und 8 zeigt, daß die lichterzeugende Reaktion durch das Vorhandensein von purer Sepharose 4B nicht beeinflusst wurde.

D. Bestimmungsverfahren

Es wurden fünf weitere spezifische Bindungsreaktionsgemische hergestellt jeweils mit einem Volumen von 0,19 ml und jeweils enthaltend 0,1 m Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid-Puffer, pH 8,0, 0,6 m Athanol, 0,01 m Semicarbazid und jeweils die in Tabelle II angegebenen Mengen bzw. Konzentrationen an NAD-Biotin-Konjugat, freiem Biotin und an Sepharose 4B gebundenem Avidin in Suspension. Jedes Reaktionsgemisch wurde auf die gleiche Weise behandelt wie die Vergleichsreaktionsgemische in Teil C dieses Beispiels. Die Ergebnisse sind in Tabelle II angegeben.

TABELLE II:

609845/1072

2618419

T A B E L L E II

Reaktions- gemisch	NAD-Biotin-Konjugat- Konzentration (nm)	Biotin- Konzen- tration (nm)	Suspension von an Sepharose 4B gebundenem Avidin (μ l)	Spitzenlicht- intensität
10	21	---	---	79,1
11	21	---	20	17,4
12	21	79	20	43,1
13	21	158	20	59,9
14	21	158	---	79,7

609845/1072

2618419

Die Ergebnisse der Reaktionen 11, 12 und 13 zeigen, daß freies Biotin und das NAD-Biotin-Konjugat wirksam um die bindenden Stellen des unlöslich gemachten Avidins in Konkurrenz treten, da die Spitzenlichtintensität abhängt von der Menge an freiem vorhandenem Biotin. Die Reaktionen 10 und 14 führten zu Ergebnissen, die zeigen, daß in Abwesenheit von unlöslich gemachtem Avidin die Spitzenlichtintensität für stark unterschiedliche Konzentrationen an freiem Biotin konstant ist.

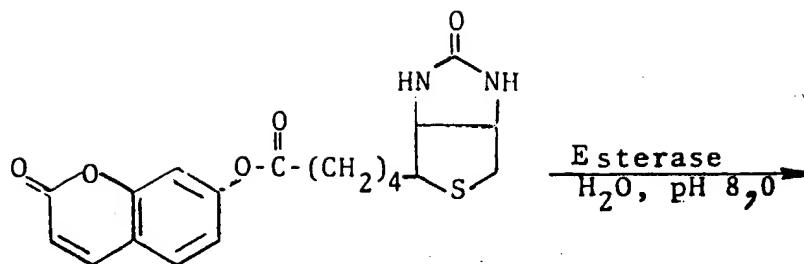
Es konnte so in diesem Beispiel gezeigt werden, daß die in der flüssigen Phase vorhandene Menge an NAD-Biotin-Konjugat umgekehrt proportional ist der Menge an vorhandenem freiem Biotin und das erfindungsgemäße Verfahren und Mittel daher geeignet sind zur Bestimmung eines Liganden in einer unbekannten Flüssigkeitsprobe.

B e i s p i e l 5

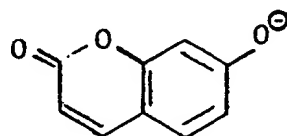
Spezifische Bindungsbestimmung für Avidin und Biotin unter Verwendung eines Enzymsubstrats als Markierungssubstanz

Die in diesem Beispiel angewandten spezifischen Bindungssysteme beruhen auf der folgenden Reaktionsgleichung:

2618419



Biotin-Umbelliferon-Konjugat



+ H⁺ + Biotin

(max. Fluoreszens bei 448 nm)

A. Herstellung von unlöslich gemachtem Bindungspartner

Avidin wurde unlöslich gemacht, indem es kovalent an wasserunlösliche Polymerperlen gebunden wurde entsprechend Teil B von Beispiel 4 mit der Ausnahme, daß nach dem Waschen mit 100 ml 0,1 m Natriumbicarbonat-Puffer, pH 9,0, die das Avidin gebunden enthaltene Sepharose 4B in 12 ml 0,1 m Tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid-Puffer, pH 8,0, suspendiert und 1:1 mit 0,1 m Bis-hydroxyäthylglycinhydrochlorid-Puffer, pH 7,0, verdünnt wurde.

B. Konkurrenz-Bindungsbestimmung von Biotin; Wirkung verschiedener Biotingehalte auf die freigesetzte Umbelliferonmenge

Es wurden acht spezifische Bindungsreaktionsgemische hergestellt, jeweils mit einem Gesamtvolumen von 0,2 ml und jeweils enthaltend 0,1 m Bis-hydroxyäthylglycinhydrochlorid-Puffer, pH 7,0, 0,3 µm Biotin-Umbelliferon-Konjugat (entsprechend Beispiel 3), 15 µl der das Avidin gebunden enthaltenen Sepharose 4B-

609845/1072

2618419

Suspension entsprechend Teil A dieses Beispiels und Biotin in den in Tabelle III angegebenen Konzentrationen. Die Reaktionsgemische wurden unter leichtem Schütteln 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jedes Reaktionsgemisch wurde zentrifugiert und 100 μ l der überstehenden Flüssigkeit mit 2 ml 0,1 M Bis-hydroxy-äthylglycinhydrochlorid-Puffer, pH 8,2, enthaltend 1,08 Einheiten Schweineesterase, zusammengegeben. Nach 5 min langem Inkubieren bei Raumtemperatur wurde die Intensität der Fluoreszens in jedem Reaktionsgemisch bei 448 nm mit einer Anregung von 364 nm mit Hilfe eines Amico-Bowman-Spektrophotofluometers gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle III angegeben.

T A B E L L E I I I

Reaktions- gemisch	Biotin-Kon- zentration (μ m)	Fluoreszens- intensität
1	0,00	0,355
2	0,10	0,495
3	0,20	0,469
4	0,30	0,503
5	0,40	0,547
6	0,50	0,502
7	0,75	0,580
8	1,00	0,688

Es konnte so in diesem Beispiel gezeigt werden, daß die in der flüssigen Phase vorhandene NAD-Biotin-Menge direkt proportional war der Menge an vorhandenem freien Biotin und damit das Bestimmungsverfahren und die Mittel geeignet sind zur Bestimmung eines Liganden in einer unbekannten flüssigen Probe.

PATENTANSPRÜCHE:

2618419

76

1A-47 862

P A T E N T A N S P R Ü C H E

- (1) Heterogenes spezifisches Bindungsverfahren zur Bestimmung eines Liganden in einem flüssigen Medium, wobei man
- (a) das flüssige Medium mit Mitteln (Reagentien) zusammenbringt, die einen markierten Bestandteil enthalten, umfassend ein Konjugat aus einer Markierungssubstanz und einer bindenden Komponente, das mit dem Liganden ein Bindungsreaktionssystem bildet und eine gebundene Phase ergibt, in der der markierte Bestandteil in gebundenem Zustand enthalten ist und eine freie Phase, in der der markierte Bestandteil in freier Form auftritt, wobei die Menge der Markierungssubstanz in der gebundenen Phase eine Funktion ist ^{von} der Menge des in dem flüssigen Medium vorhandenen Liganden;
- (b) die gebundene Phase von der freien Phase trennt und
- (c) die Menge der Markierungssubstanz bestimmt, die entweder in der gebundenen oder in der freien Phase vorliegt, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Markierungssubstanz verwendet, die in einem vorher bestimmten Nachweisreaktionssystem Reaktionsfähigkeit besitzt und ^{von Stufe} (c) mit der gebundenen oder freien Phase das Nachweisreaktionssystem bildet und die Reaktionsfähigkeit bei der Nachweisreaktion als Maß für die Menge der in der jeweiligen Phase vorhandenen Markierungssubstanz heranzieht.

- 2 -
77

(2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zuerst genannte Markierungssubstanz ein Reagens in einer enzymatischen Reaktion ist.

(3) Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungssubstanz ein Coenzym oder eine aktive Modifikation davon ist.

(4) Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungssubstanz ein Nucleotid-Coenzym oder eine aktive Modifikation davon ist.

(5) Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungssubstanz ein Adenosinphosphat, Nicotinamidadenindinucleotid oder eine reduzierte Form davon oder Nicotinamidadenindinucleotidphosphat oder eine reduzierte Form oder aktive Modifikation davon ist.

(6) Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungssubstanz Nicotinamidadenindinucleotid oder eine reduzierte Form davon oder aktive Modifikation davon ist.

(7) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungssubstanz ein Reagens in einem lichterzeugenden Reaktionssystem ist.

(8) Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungssubstanz Luminol, Isoluminol oder eine aktive Modifikation davon ist.

- 3 -
78

(9) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungssubstanz ein Reagens in einem Reaktionssystem ist, bei dem ein Produkt entsteht, das Fluoreszenzeigenschaften besitzt, die es von dem Konjugat unterscheiden.

(10) Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungssubstanz Umbelliferon oder eine ^{aktive} Modifikation oder ein Derivat davon ist oder Fluorescein oder eine ^{aktive} Modifikation oder ein Derivat davon ist.

(11) Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungssubstanz ein Molekulargewicht von weniger als 9 000, vorzugsweise weniger als 5 000 besitzt.

(12) Verfahren nach Anspruch 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktionsfähigkeit in der gebundenen oder freien Phase dadurch bestimmt, daß man die jeweilige Phase mit mindestens einer Substanz zusammenbringt, die zusammen mit der Markierungssubstanz das vorher bestimmte Nachweisreaktionssystem ergibt, die Menge der in der Phase vorhandenen Reaktionsfähigkeit mißt und die gemessene Reaktionsfähigkeit mit derjenigen vergleicht, die nach dem gleichen Verfahren bei einem flüssigen Medium erhalten wird, das bekannte Mengen des Liganden enthält.

(13) Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktionsfähigkeit mißt durch Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit des vorher bestimmten Reaktionssystems.

- 4 -
25

(14) Verfahren nach Anspruch 12 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das vorbestimmte Na hw is Reaktionssystem eine cyclische Reaktion umfaßt.

(15) Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die bei der cyclischen Reaktion cyclisierte (zurückgeführte) Substanz die zuerst erwähnte Markierungssubstanz ist.

(16) Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die cyclische Reaktion eine exponentielle cyclische Reaktion ist.

(17) Verfahren nach Anspruch 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das vorher be-
Chemie- stimmte Reaktionssystem eine Lumineszenzreaktion umfaßt.

(18) Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Charakteristikum
oder die Gesamtmenge / die Spitzenintensität des entstehenden Lichtes ist.

(19) Verfahren nach Anspruch 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktionsfähigkeit mißt durch Bestimmung der Geschwindigkeit der Änderung der Fluoreszenzintensität oder der Gesamtänderung der Fluoreszenzintensität.

(20) Verfahren nach Anspruch 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe (a) den spezifisch bindenden Partner im wesentlichen gleichzeitig mit dem flüssigen Medium und dem Konjugat unter Bildung eines Gemisches zusammenbringt.

(21) Verfahren nach Anspruch 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß man einen löslichen spezifischen Bindungspartner in dem Gemisch verwendet und eine vorher bestimmte Zeit nach dem Zusammenbringen des Mediums mit dem Konjugat und dem bindenden Partner ein Mittel zusetzt, das den bindenden Partner gegenüber dem Gemisch unlöslich macht.

(22) Verfahren nach Anspruch 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß man einen spezifischen Bindungspartner verwendet, der in dem Gemisch unlöslich ist.

(23) Verfahren nach Anspruch 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe (a) das flüssige Medium mit dem spezifischen Bindungspartner zusammenbringt und nach einer vorher bestimmten Zeit das Konjugat zu dem Gemisch zusetzt.

(24) Verfahren nach Anspruch 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe (a) ein nicht-spezifisch bindendes Mittel für den Liganden im wesentlichen gleichzeitig zu dem flüssigen Medium und dem Konjugat zusetzt und nach einer vorher bestimmten Zeit das bindende Mittel mit dem spezifisch bindenden Partner zusammenbringt.

(25) Verfahren nach Anspruch 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe (a) eine unlösliche Form des Liganden oder eines Analogen davon im wesentlichen gleichzeitig mit dem flüssigen Medium und dem Konjugat zusammenbringt.

- (26) Verfahren nach Anspruch 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe (a) das flüssige Medium und das Konjugat zusammenbringt und nach einer vorher bestimmten Zeit die unlösliche Form des Liganden oder Analogen des Liganden dazu gibt.
- (27) Verfahren nach Anspruch 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Reagens als Markierungssubstanz verwendet, dessen Aktivität beeinflusst wird durch die Bindung des markierten Bestandteils des Reagenses in dem Bindungsreaktionssystem.
- (28) Verfahren nach Anspruch 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Reagens verwendet, das eine unlösliche Form eines Konjugats, umfassend die Markierungssubstanz, die an den spezifisch bindenden Partner des Liganden gebunden ist, umfaßt.
- (29) Verfahren nach Anspruch 1 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand ein Antigen oder ein Antikörper dazu, ein Hapten oder Antikörper dazu, ein Hormon, Vitamin, Metabolit, pharmakologisches Mittel oder Rezeptor dazu oder bindende Substanz ist.
- (30) Verfahren nach Anspruch 1 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das flüssige Medium eine biologische Flüssigkeit ist.
- (31) Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 30, enthaltend einen markierten Bestandteil der ein Konjugat aus einer Markierungssubstanz und

- 7 -

82

einer bindenden Komponente enthält und imstande ist, mit dem Liganden ein Bindungsreaktionssystem zu bilden, das eine gebundene und freie Phase des markierten Bestandteils ergibt, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungssubstanz Reaktionsfähigkeit besitzt in einem vorbestimmten Reaktionssystem zum Nachweis der Menge der Markierungssubstanz in der jeweiligen Phase.

(32) Mittel nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungssubstanz Nicotinamidadenindinucleotid, eine reduzierte Form von Nicotinamidadenindinucleotid oder eine aktive Modifikation davon ist und als eine die Nachweisreaktion bildende Substanz:

- (A) (a) Lactaldehyd und Alkoholdehydrogenase;
(b) α -Ketoglutarat, eine Substanz, die imstande ist, bei Berührung mit dem flüssigen Medium Ammoniak freizusetzen und Glutaminsäuredehydrogenase;
(c) Acetaldehyd und Alkoholdehydrogenase;
(d) α -Ketoglutarat, eine Substanz, die imstande ist, bei Berührung mit dem flüssigen Medium Kohlendioxid freizusetzen und Isocitronensäuredehydrogenase;
(e) Dihydroxyacetonphosphat und α -Glycerinphosphatdehydrogenase;
(f) Pyruvat und Milchsäuredehydrogenase;
-